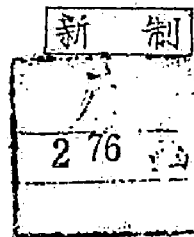


Title	ブロムモザイクウイルスのプロトプラスト系における感染・増殖過程の研究(Dissertation_全文)
Author(s)	奥野, 哲郎
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	1979-05-23
URL	http://dx.doi.org/10.14989/doctor.k2230
Right	
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	author



ブロムモザイクウイルスのプロトプラスト
系における感染・増殖過程の研究

1979

奥 野 哲 郎

ブロムモザイクウイルスのプロトプラスト
系における感染・増殖過程の研究



1979

奥 野 哲 郎

目 次

第 I 章	序 論	1
第 II 章	葉肉細胞プロトプラストの 調製	7
第 1 節	単子葉植物	7
第 2 節	双子葉植物	23
第 III 章	B M V 粒子によるプロトプ ラストの感染	27
第 1 節	感染様式	27
第 2 節	浸透圧変化の影響	51
第 3 節	感染機構	58
第 IV 章	プロトプラスト系と植物体 レベルでの B M V 感染の比 較	75
第 V 章	B M V R N A によるプロト プラストの感染	83
第 VI 章	B M V の増殖過程	106
第 1 節	B M V の増殖に影響する 因子	106
第 2 節	B M V 感染特異的 R N A	

	ポリメラーゼ活性	116
第3節	B M V 感染特異的蛋白質 合成	136
第Ⅷ章	総合考察	162
第Ⅸ章	摘要	173
	引用文献	182

第I章 序 論

近年、多くの植物ウイルスは多分節ゲノムを持つことが明らかにされてきた。^{43,110)} このことはウイルスのゲノムが物理的に分れたいくつかの部分より構成されていること、すなわちウイルスの感染・増殖に必要な遺伝子がいくつかのRNA分子に分れて存在することを意味する。動物のRNAウイルスにおいても、ゲノムが分節構造を持つことはミクソウイルス^{20,83)}群やレオウイルス群^{32,97)}で明らかにされてきた。動物ウイルスの場合、一般に分節ゲノムRNA分子は単一のウイルス粒子に含まれているが、植物ウイルスの分節ゲノムRNA分子はそれぞれ別々の粒子 (virion) を構成する。従って多分節ゲノムを持つ植物ウイルスを表わす場合、しばしば多粒子性ウイルスという言葉が使われる。しかし、ゲノムが分節構造を取ることとを共通概念として認識するため、筆者は多分節ゲノムという言葉を用いる。

ブルームモザイクウイルス (BMV) はブル

モウイルス群に属する三分節ゲノムを持つ直径約25 nmの小型球形RNAウイルスである⁵⁵⁾。BMVは3種の核蛋白質より成り、最も重い粒子はRNA1を、最も軽い粒子はRNA2を、また中間の粒子はRNA3とRNA4を含む⁵⁶⁾。感染性には3種の粒子すべて、あるいはRNA1、2と3が必要とされる⁵⁶⁾。RNA4は感染性に関係なく、増殖過程において再生され子孫ウイルスには必ず含まれる⁵⁵⁾。BMVも三分節ゲノムの概念が確立されるまでは、分子量約 1×10^6 ダルトンの単一RNA分子を含む分子量約 4.6×10^6 ダルトンの均一の核蛋白質粒子より成ると考えられていた^{9,10,11)}。また、BMVから抽出されたRNAを蔗糖濃度勾配遠心分離法で分析すると、分子量約 1×10^6 、 0.7×10^6 と 0.3×10^6 ダルトンの3種の分子種に分かれたが、感染性が最も大きなRNAに存在することより、他のRNAは大きなRNAの分解産物と考えられた^{10,11)}。しかし、ポリアクリルアミドゲル電気泳

動により B M V R N A は分子量 1.09×10^6 , 0.99×10^6 , 0.75×10^6 と 0.28×10^6 の 4 種 (分子量の大きなものより R N A 1, R N A 2, R N A 3 と R N A 4) の分子種に分かれ, それぞれ単独では感染性がなく R N A 1, R N A 2 と R N A 3 を混合してはじめて感染性を持つことが明らかになった。⁵⁶⁾

なお, R N A 4 は外被蛋白質の情報を持って⁵⁶⁾いるが感染性には関係せず, 増殖過程において R N A 4 の相同塩基配列を含む R N A 3 より何らかの機構で再生するものと考えられた。⁹⁸⁾

。 B M V の 4 種の R N A は *in vitro* 蛋白質合成系でそれぞれモノシストロニック・メッセンジャー R N A (*m* R N A) として働く。^{99, 100)} この場合 R N A 4 は最も活性が高く, 他の R N A が共存した場合も, その翻訳産物は主に外被蛋白質であることが知られている。^{99, 100)} このような B M V の感染・増殖過程を *in vivo* で生物・生化学的に解析するためにはウイルスの同調的増殖の可能な系での研究が望まれる。

同調化一段増殖実験系の概念は Ellis と Delbrück²¹⁾ (1935) によりバクテリオファージの系に導入され、その後の生物学とくに今日分子生物学と呼ばれる分野の基礎をつくった。それゆえ植物ウイルス学においてもウイルスの同調増殖系は長年切望されてきた。しかし、この問題はプロトプラスト系の導入により一挙に解決された。^{105, 106, 109)}

原形質分離させた細胞の細胞壁を機械的に壊すことによりプロトプラスト (原形質体)¹⁷⁾ が得られることは古くより知られていた。しかし、この方法ではある限られた植物種の特異な細胞にしか適用できず、分離できるプロトプラストの数も限られていた。¹⁷⁾ Cocking (1960)¹⁶⁾ はプロトプラストの分離に細胞壁分解酵素を用いた。この酵素的方法は、大量のプロトプラストを比較的短時間で分離できる点で、機械的方法に優っていた。わが国における微生物生産学の進歩、とくに良質の細胞壁分解酵素が容易に使用できるようになったこ

とを背景に、建部とその共同研究者らはウイルスの増殖実験に耐えうる葉肉細胞プロトプラストの基本的調製法を開発し⁽¹⁰⁸⁾、TMV⁽¹⁰⁹⁾とTMV-RNA⁽²⁾がタバコプロトプラストに感染し、同調的に増殖することを相次いで証明して、植物ウイルス学の新時代をつくった。筆者はプロトプラスト系を用いBMVの感染・増殖過程の研究を行ってきた。^(4, 29, 30, 31, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76)

本論文ではBMVの感染と増殖の実験に耐えうるプロトプラストの分離・調製法を第二章で、BMV粒子による効率的な感染を得るための条件とその感染機構を第三章で、またBMV-RNAによる感染を第四章で述べる。第四章ではBMV感染をプロトプラスト系と植物体レベルで比較し、植物病理学領域でのプロトプラスト系の今後の役割について考察する。第五章では筆者が開発したプロトプラスト-BMV系を用いて、BMVの増殖過程における感染特異的RNAポリメラーゼ活性と感染特異的蛋白質合成について述べる。

本稿を草するにあたり、常に本研究に対する援助をおしまれず本論文作成にあたり校閲の労をとられた山本昌木教授、ならびに終始鞭達と援助をおしまれなかつた獅山慈孝助教授、また本論文校閲の労をとられた上山昭則教授と駒野徹教授に深く感謝の意を表する。また終始懇切なる指導と有益な助言を頂いた古沢厳助手に厚く感謝の意を表する。また本実験を行うにあたり多くの助言と援助を頂いた当研究室員の諸氏に感謝の意を表する。なお本研究中いろいろと有益な助言を頂いた農林水産省植物ウイルス研究所の建部到博士（現名古屋大学教授）と大概義昭博士、大阪市立大学助教授古沢満博士、ならびに本実験中いろいろと援助していただいた三重大学助教授久能均博士、京都大学教授竹内郁夫博士、同助教授姫野道夫博士、同助手佐々木幸子博士、香川大学教授谷利一博士と朴均允博士に深く感謝の意を表する。

第二章 葉肉細胞プロトプラストの分離と調製

第1節 単子葉植物

建部らによりタバコ葉肉細胞プロトプラストの分離・培養法が確立されて以来¹⁰⁸⁾、プロトプラスト系は植物ウイルス学¹⁰⁵⁾をはじめ植物生理学¹⁷⁾、あるいは植物育種学的基礎研究^{45, 68, 107)}にも急激に利用されるようになった。さまざまな植物からのプロトプラストの分離に関する報告は多いが^{17, 77, 105)}、プロトプラストの調製は、用いる植物の生理状態などさまざまな因子によって大きく影響される。単子葉植物、とくにイネ科植物のプロトプラスト分離の最適条件は研究者によって一定でない^{24, 27, 36, 45, 46, 70, 77, 92, 94, 108)}。さらに、良質のトウモロコシプロトプラストを得るためにはかなり煩雑な純化操作を必要とする場合がある⁴⁶⁾。ここで述べる方法によって単子葉植物から良質のプロトプラストを大量にしかも非常に簡単に得ることができる。

材料 と 方法

植物 オオムギ (*Hordium vulgare* L. cv. Moore),
 コムギ (*Triticum aestivum* L. cv. 農林一 号), カラス
 ムギ (*Avena sativa* L. cv. Victoria) と トウモロコシ (*Zea mays* L. cv. Golden) を用いた。オオムギ, コムギ
 とカラスムギの種子は水道水で一日水洗後,
 トウモロコシの種子は水洗せずそのまま, バ
 ーミキュライトを入れた底に穴のあいたプラ
 スティック箱 (18 × 12 × 5 cm) に 30 ~ 50 粒ずつ
 播き, 種子が隠れる程度にバーミキュライト
 を重層した。プラスチック箱は昼間 22 ± 2
 °C, 夜間 20 ± 2 °C に調整されたガラス
 室に置き, 自然光下で 1 日 1 回 1 時 / 日のハイ
 ポネックスを含む水を与えて植物を育成した。
 とくに記さないう限り, オオムギ, コムギ, カ
 ラスムギの場合には, 播種後 6 ~ 8 日目のオ
 ー葉を, トウモロコシの場合には約 14 日目
 のオーとオニ葉をプロトプラスト調製条件検
 討のために用いた。

プロトプラストの生死の判定

プロトプ

ラスト懸濁液に1%ニグロシンBを含む0.7 Mマンニトール溶液を1滴加え、光学顕微鏡で観察した。正常なプロトプラストは染色されないが、膜の破損したものは濃青に染色された。

結 果

酵素組成と濃度の影響 背軸側表皮を除去した1♀のオオムギ葉を、セルラーゼ・R-10（近畿ヤクルト）とマセロザイム・R-10（近畿ヤクルト）をさまざまな濃度で含む0.6 Mマンニトール（pH 5.6）10 ml に浸漬し、毎分80回の振とう処理を23℃で2.5時間行った。その結果を表1に示す。1%以上の濃度のセルラーゼを用いた場合、すべての葉肉細胞は完全に遊離してプロトプラストとして得られた。マセロザイムをセルラーゼに加えてもプロトプラスト収量を高める効果はなく、マセロザイムだけではほとんど細胞は遊離しなかった。デキストラン硫酸カ

表1 オオムギプロトプラストの分離とBMV感染に及ぼす酵素組成と濃度の影響

酵素濃度 (%)		プロトプラスト 収量 ^{b)} ($\times 10^{-6}/g$)	正常プロトプラスト ^{c)} (%)		感染率 ^{d)} (%)
セルラーゼ ^{a)}	マセロザイム ^{a)}		0	48 (時間)	
3	0.15	5.2	95	85	48.2
2.5	0.125	5.5	91	84	52.0
2	0.1	5.4	94	77	50.4
1.5	0.075	5.3	94	82	44.1
1	0.05	5.3	95	80	48.8
0.5	0.025	4.3	93	80	46.0
0.25	0.0125	2.2	95	79	20.4
3	-	6.2	92	73	43.6
2.5	-	5.4	92	71	34.4
2	-	5.7	95	78	56.8
1.5	-	5.3	93	84	40.0
1	-	6.1	94	83	42.4
0.5	-	3.5	94	80	18.8
0.25	-	2.3	95	78	18.2

a) R-10 (近畿ヤクルト)

b) プロトプラストを100g, 3分の遠心分離で集め, さらに0.6Mマニトールで2回洗浄後, 血球計数計で測定。

c) ニグロシン染色により判定。

d) 0.7Mマニトールを含む0.1Mクエン酸緩衝液, pH5.0, 20mg/ml BMVで接種, 48時間後に蛍光抗体染色法で判定(第IV章, 第1節参照)。

リ塩はタバコ葉より葉肉細胞を正常な状態で分離するのに不可欠な因子であるが、オオムギプロトプラストの分離には何ら影響が見られなかった。1%以下のセルラーゼ濃度で分離されたプロトプラストは、それより高い濃度で分離されたプロトプラストに比べ、BMV感染に対して感受性が低かった（表1）。光学顕微鏡による観察では、両者のプロトプラストで形態的な差は認められなかったが、低濃度セルラーゼで分離されたプロトプラストにはまだ細胞壁成分が残存していて、それがBMV感染を妨げたものと思われる。

溶液浸透濃度の影響 0.5 M以上のマンニトール濃度下で分離されたプロトプラストは非常に安定であったが、それ以下の濃度では50%以上の細胞が酵素処理中に破損あるいは障害をうけ、プロトプラストとして分離された細胞も大半が培養48時間以内に死んだ（表2）。しかし、低いマンニトール濃度で分離されたプロトプラストほどBMV感染

に対して感受性が高かった（表2）。なお、浸透濃度のBMV感染に及ぼす影響については第Ⅲ章第2節でくわしく述べる。

酵素処理温度の影響 セルラーゼ活性の最適温度は37℃付近であるが、30℃以上で分離されたオオムギプロトプラストはしばしば培養中に死ぬことがあった。また、20℃以下ではセルラーゼ活性が弱く、プロトプラストの分離に時間がかかった。しかし、24±2℃の処理により30℃とほぼ同じ効率でプロトプラストが分離でき、それらは培養中も安定であった。

植物の生育状態と齡の影響 活性の高い良質のプロトプラストを大量に得るためには、プロトプラストを分離する植物の生育状態に注意を払う必要がある。建部ら⁽¹⁰⁸⁾と本吉らはタバコプロトプラストを分離する場合、用いる植物の齡と葉位にその成否が大きく影響されることを指摘した。オオムギの場合は、表3に示したように播種後6から8日目の第一葉

表2 オオムギプロトプラストの分離とB.M.
V感染に及ぼす分離時のマンニトール
濃度の影響^{a)}

マンニトール濃度 (M)	プロトプラスト 収量 ($\times 10^{-6}/g$)	正常プロトプラスト (%)		感染率 (%)
		0	48 (時間)	
0.80	5.9	93	70	38.8
0.75	5.7	89	73	41.7
0.70	6.0	91	71	45.5
0.65	6.2	95	71	41.4
0.60	5.6	92	72	45.9
0.55	6.2	85	70	46.7
0.50	6.0	85	69	62.5
0.45	6.2	82	45	65.1
0.40	3.6	83	35	61.3
0.35	1.5	67	0	-
0.30	0.8	60	0	-
0.25	-	0	0	-

a) 1% セルラーゼで分離。その他の条件は表1脚注を参照。

がプロトプラストの分離に最も適していた。植物齢が14日を越えると、そこから分離されたプロトプラストは培養48時間以内に死に、BMV感染に対する感受性あるいはウイルス増殖を維持する生理活性も低かった(表3)。また、植物生育時の温度が30℃を越えたり、水の供給が過多で根の発達の悪い、あるいはハイポネックスを与えずに育てた植物から分離したプロトプラストはその大半が分離・培養中に死んだ。

プロトプラストの培養 建部の培養液⁽¹⁰⁸⁾においてpHを変えた場合、pH 5.5と7.0の間ではほとんどその影響は見られなかったが、pH 6.5の時オオムギプロトプラストは最も安定であった(表4)。一般にプロトプラストは光に対して非常に感受性が高く、強照度下で培養すると葉緑体の漂白化が進むことは知られている。オオムギプロトプラストも3,500ルクスよりも800ルクスで培養する方がより安定であった(表4)。また

表3 オオムギプロトプラストの分離とBM
V感染に及ぼす植物の齢の影響^{a)}

播種後 の 日数	正常プロトプラスト (%)		感染率 (%)
	0	48 (時間)	
6	96.0	86.0	50.0
8	93.0	83.8	48.8
10	86.1	74.1	44.5
14	66.3	5.5	8.0

a) 条件は表1と表2の脚注を参照。

表4 オオムギプロトプラストの培養に及ぼすpHと照度の影響

培養 時間	照度 (lux)	正常プロトプラスト (%)			
		pH			
		5.5	6.0	6.5	7.0
24	800	87.9	88.3	89.7	87.8
48		68.2	80.6	86.6	74.3
24	3500	67.6	76.3	84.1	69.7
48		56.5	68.2	73.0	64.6

プロトプラストは暗黒下培養で最も安定であつたが、そのような条件ではBMVはほとんど増殖できなかつた（第四章第1節）。したがつてBMV増殖が阻害されず、かつプロトプラストの安定性が保たれるためには、1,000ルクス前後の照度が適していた。オオムギプロトプラストは25°C以下の培養では非常に安定であつたが、30°C以上になるとしばしば培養中に死ぬことがあつた。プロトプラスト分離・調製時を通して細菌と菌類の混入に対する特別な注意は払わなかつたが、クロラムフェニコールとナイスタティンを培養液に加えることにより混入した細菌と菌類の増殖は、少なくともプロトプラスト培養48時間までは完全に抑制できた。しかし、培養が3日以上になるとしばしば培養液が白濁し、光学顕微鏡下で細菌と菌類が認められることがあつた。培養液の組成を表5に示す。

コムギ、カラスムギとトウモロコシのプロトプラスト オオムギプロトプラスト分離

表5 プロトプラスト培養の組成^{a)}

KH_2PO_4	0.2 mM
KNO_3	1 mM
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 mM
CaCl_2	10 mM
KI	1 μM
CuSO_4	0.01 μM

クロラムフェニコール 200 $\mu\text{g/ml}$

ナイスタチン 25 units/ml

マンニトール 0.7 M

pH 6.5

a) 引用文献 108 を参照。

培養の最適条件下でコムギ、カラスムギとトウモロコシからも効率良く良質のプロトプラストが分離、培養できた（表6）。それらの光学顕微鏡下での形態を図1に示す。プロトプラストの分離に用いる植物の齡と葉位はトウモロコシを除きオオムギと同様であった。トウモロコシの場合は、播種後約2週間の植物のオ1葉とオ2葉のどちらも背軸側表皮の除去が容易で、プロトプラストの分離に適していた。コムギとトウモロコシからのプロトプラストの収量（ $1.5 \sim 3 \times 10^6$ 個/1枚生重葉）はオオムギとカラスムギの収量（ $4 \sim 6 \times 10^6$ 個/1枚生重葉）の約半分であった。これらのプロトプラストはいずれもBMVに感染し、少なくとも48時間の培養中安定であった（表6）。

考察 と 結論

従来、単子葉植物からの葉肉細胞プロトプ

表6 コムギ、カラスムギ、トウモロコシと
オオムギのプロトプラスト分離とBM
V感染^{a)}

植物	プロトプラスト 収量 ($\times 10^{-6}$)	正常プロトプラスト (%)		感率率 (%)
		0 (時間)	48	
コムギ	2-3	90<	65<	30-55
カラスムギ	4-5	90<	60<	40-50
トウモロコシ	1.5-3	90<	60<	25-50
オオムギ	5-6	90<	70<	40-60

a) 数値は5〜7回の実験結果。

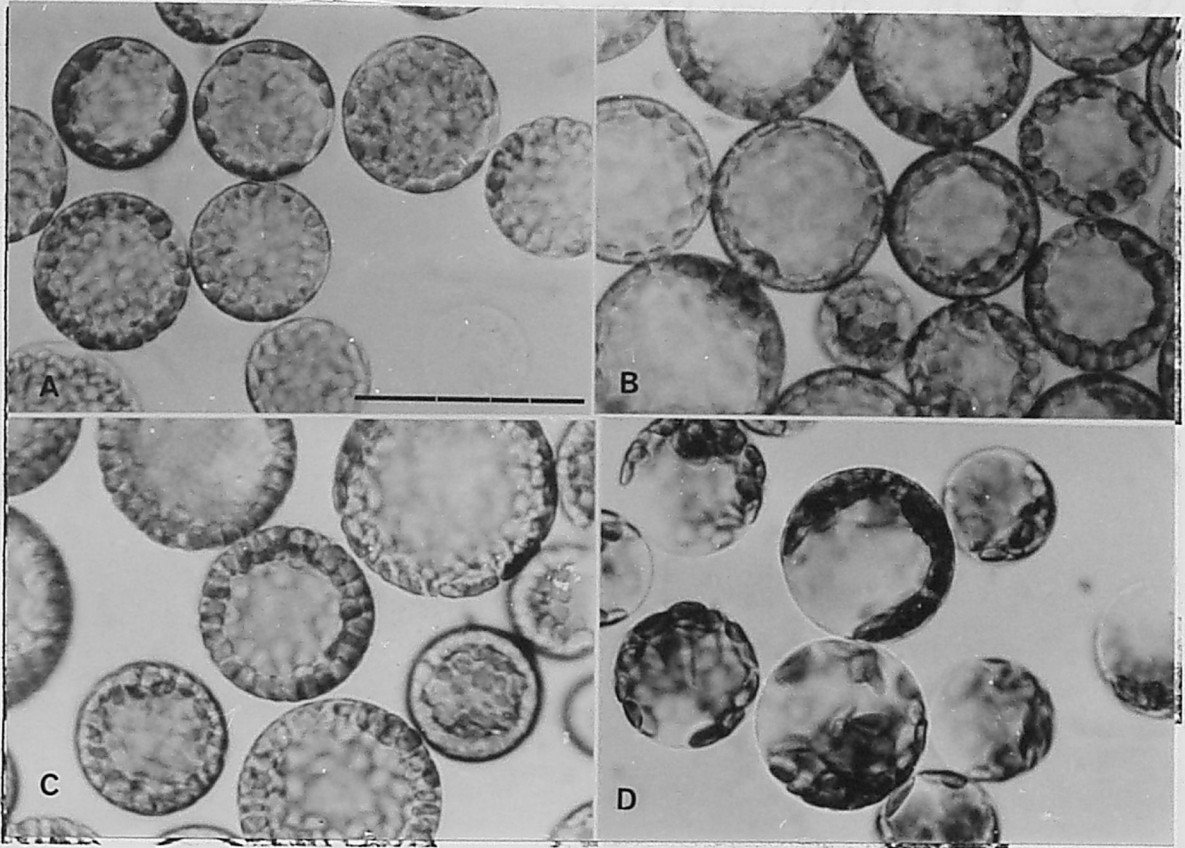


図1 プロトプラストの光学顕微鏡写真

A. オオムギ, B. カラスムギ, C. コムギ, D. トウモロコシ

— : 50 μm

ラストの分離は切り刻んだ葉を酵素処理することにより行われてきたが、^{24, 46, 94)} その場合のプロトプラストの収量は本法の約 $\frac{1}{10}$ 程度であり、細胞の断片と死細胞が多く混入するため、良質のプロトプラストだけを得ることは困難であった。筆者の方法は今まで報告されてきたいずれの方法よりも簡単で、短時間に、大量の葉肉細胞プロトプラストを得ることができる。プロトプラスト分離のための処理方法に関しては、振とうを加えず、表皮をはく離した側を下にして酵素液に浮べるだけでも効率良くプロトプラストが分離できた。このような方法で分離されたプロトプラストは、分離直後の酵素液中ではほとんどすべてが正常であったが、不安定なものはプロトプラスト洗淨時に破壊され、結果的には振とう処理で得られたプロトプラスト収量と同様であった。

単子葉植物より葉肉細胞プロトプラストを得るためとくに重要な事項を以下に述べる。

i) オオムギ、コムギとカラスムギの場合は

播種後 6 ~ 8 日目のカ 1 葉を, トウモロコシの場合は播種後 13 ~ 15 日目のカ 1 葉とカ 2 葉を使うこと。ii) いずれの植物も根の発達を抑えない程度に 1 日 1 回ハイポネックスを含んだ水を与え, 十分な自然光下, 20 ~ 25 °C で生育させること。iii) 背軸側表皮が比較的容易にはく離できる葉を使うこと。iv) プロトプラスト分離時のマンニトール濃度は 0.5 M 以上 0.85 M 以下を使うこと。

第 2 節 双子葉植物

双子葉植物からの葉肉細胞プロトプラストの分離法は一段階法と二段階法に分けられる。二段階法はまずペクチン質分解酵素 (例: マセロザイム) 処理により葉肉細胞を細胞壁を持った状態で分離し, その遊離細胞をセルラーゼのような細胞壁分解酵素で処理してプロトプラストを得るものである⁽¹⁰⁸⁾。一段階法は両酵素を同時に作用させ直接プロトプラストを

得る方法である。³⁶⁾ここでは単子葉植物の場合と同様、一段階法により直接プロトプラストを分離した結果を述べる。

材 料

タバコ (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright) と グルチノ
ーガタバコ (*Nicotiana glutinosa* L.) の種子をバー
ミキュライト上に播種した。2~3週間後、
幼苗をバーミキュライトを入れた植木ばちに
移植し、30℃、自然光のガラス室で、夜間
には花芽分化を抑制するため弱光(800ル
ックス)を与えて育てた。なお、毎日1回ハ
イポネックスを含んだ水を与えた。ダイコン
(*Raphanus sativus* L. cv. 早生) もタバコと同様に育
てた。*Chenopodium hybridum* L. の場合は種子を濃硫酸
で5~7分処理し、水道水で2~3日水洗し
た後播種し、同様にして育てた。

結 果 と 考 察

タバコ 移植30~50日後の植物の

20 ~ 25 cm の長さの中位の葉を用いた。葉は水道水で洗った後、ピンセットで裏表皮をはく離し、はいだ側を下にして酵素液に浮べた。酵素液の組成については、1% セルラーゼだけでもかなりの細胞がプロトプラストとして分離できるが、マセロザイムを0.05%の濃度で加えると分離効率にはるかに良くなった。pH 5.6 の酵素液を用いると、30℃、2.5 時間の処理ですべての葉肉細胞をプロトプラストとして得ることができた。

ダイコン 条件はタバコの場合とほとんど同じであったが、酵素処理時の温度が30℃を越えると分離プロトプラストは培養時にすべて死んだ。26℃、3.5 時間の酵素処理でほぼすべての葉肉細胞をプロトプラストとして得ることができた。

C. hybridum 4 葉期から 8 葉期の肉厚の葉が適していた。タバコと同様の条件ではすべての細胞をプロトプラストとして分離するのに時間がかかったが、セルラーゼとマセロザ

イム濃度をそれぞれ2%と0.1%にすると、
32℃、3.5時間の酵素処理でほぼすべての
葉肉細胞をプロトプラストとして得ることが
できた。いずれの場合も酵素処理中にペトリ
皿を時々揺るとプロトプラストの分離を促進
した。このような一段階法による分離では、
二段階法で遊離細胞分離のとき不可欠であ
たデキストラ¹⁰⁸⁾ン硫酸カリ塩は不必要であった。

第五章 B M V 粒子によるプロトプラ ラストの感染

第1節 感染様式

プロトプララストにウイルスを感染させるための接種時の条件は、用いるプロトプララストとウイルスの種類によりそれぞれ異なる。^{1, 36, 51, 61, 62, 63, 64, 66, 71, 79, 86)} いずれの場合もウイルス粒子自身あるいはウイルス粒子とポリカチオン複合体の正電荷が感染において重要な役割を持っているが、その詳細についてはまだ明らかでない。¹⁰⁵⁾ 本節では、まずオオムギプロトプララストの B M V 感染に影響するいくつかの因子について述べ、つぎに塩基性アミノ酸ポリマーの一種であるポリオルニチンの感染における役割と、ウイルス粒子とプロトプララスト膜の静電氣的性質と感染効率との関係について述べる。

材料 と 方法

ウイルス B M V は比留木教授（アルバータ大学，カナダ）より分譲された野性株（

A T C C 66) を用いた。播種後 7 ~ 10 日目のオオムギのオ1葉にカーボランダム (600 ヲッシュ) をふりかけ, $0.5 \sim 1 \text{ mg/ml}$ B M V 溶液を指で軽くこすって接種した。供試植物は 20°C , 自然光のガラス室で育て, 10 ~ 14 日後に葉を刈り取り, 約 $0.5 \sim 1 \text{ cm}$ に切り刻んで -20°C で凍結した。凍結葉に等重量の $0.5 \text{ M} \cdot \text{K H}_2\text{P O}_4$ を加え, ミキサーで摩砕し, 4 層のガーゼでろ過した。そのろ液を約 1 時間, 室温に放置した後, $6,000 \text{ rpm}$ (約 $8,000 \text{ g}$), 10 分の遠心分離で上澄を得た。その上澄を $105,000 \text{ g}$, 90 分で遠心分離した。得られた沈殿は 2 mM MgCl_2 を含む 0.05 M 酢酸緩衝液, $\text{pH } 5.0$ に懸濁し, 一夜冷蔵庫に放置した。このウイルス懸濁液は, $10,000 \text{ g}$, 15 分と $105,000 \text{ g}$, 90 分の遠心分離操作をさらに数回繰り返し, ウイルスを純化した。最終的に得られたウイルス沈殿は 7% エテレングリコールと 2 mM MgCl_2 を含む 0.05 M 酢酸緩衝液,

pH 5.0 に溶かし, 5 mg/ml BMV の懸濁液として -20°C で凍結保存した。ただし, BMV 濃度は O.D. 260 nm で $5 \text{ cm}^2/\text{mg}$ の値¹¹⁾を用いて計算した。

プロトプラストの接種 プロトプラスト分離時のマンニトール濃度は 0.6 M を, 接種時は 0.7 M を用いた。分離プロトプラストを 50 ml 用遠心用試験管に移し, 100 g, 3 分の遠心分離で集めた。プロトプラストを 0.6 M マンニトールに懸濁し, 同様の遠心操作でさらに 2 回洗浄した後, 約 5×10^5 個/ml になるよう 0.7 M マンニトールに懸濁した。標準的接種は以下のように行った。5 ml のプロトプラスト懸濁液を 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BMV, 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ポリオルニチン (分子量 122,000, シグマ) と 0.7 M マンニトールを含む等量の 0.2 mM クエン酸緩衝液, pH 5.0 に加え, 室温に 10 分置いた。その間パラフィルムで栓をした 10 ml フッセルマン試験管を時々上下してプロトプラストを混ぜた。未吸着ウ

ウイルスを除くため、接種されたプロトプラストを遠心分離で集め、さらに2回10 mM CaCl_2 を含む0.7 M マンニトールで洗淨した。プロトプラストは 5×10^5 個/ml, 23°C , 800 ルックスで培養した。

蛍光抗体法 BMV 特異抗体は以下のよう
に作成した。純化 BMV 溶液 (5 mg/ml) 1 ml にアジュバントを等量加え乳化した後、ウサギの皮下部に注射した。注射は5~7日間隔で4~5回行った。最後の注射より約1週間後、耳の静脈より5~20 ml 採血し、図2に示した操作に従って α -グロブリン画分を得た。フルオレセインイソチオシアネート (FITC) 結合抗体の作成は川村⁴⁷⁾による Marshall 法の改良法に従った。ウイルス抗体の総蛋白質量の100分の1相当量の FITC を、蛋白質溶液の10分の1相当量の0.5 M 炭酸重炭酸緩衝液、pH 9.5 に溶かし、マグネティックスターラーであわをたてないようにかくはんしながら、徐々に蛋白質溶液を加

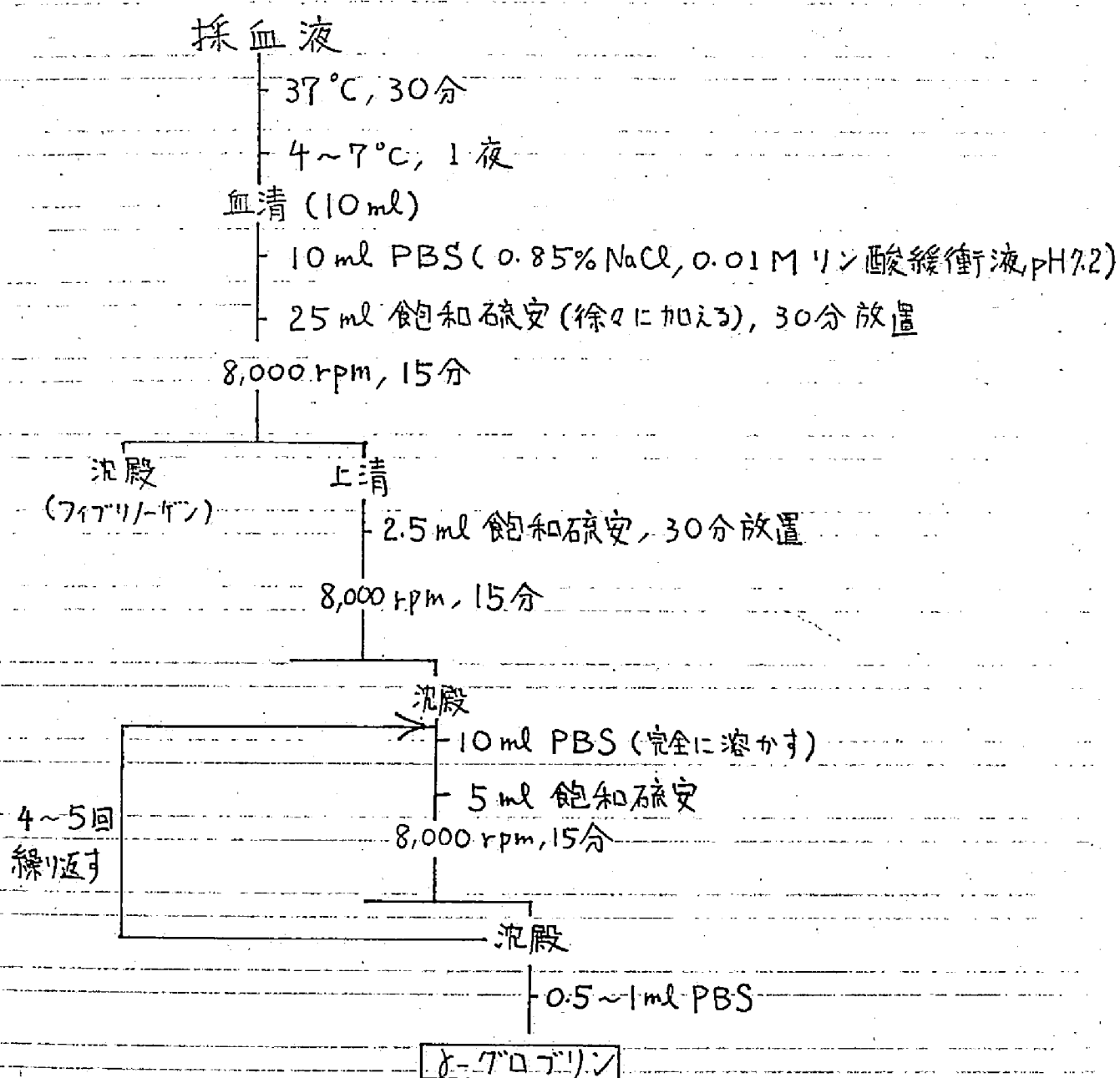


図 2 硫酸アンモニウム法による γ-グロブリンの精製

えた。7~8℃で3~4時間かくはんした後、セファデックス G 25 ゲルろ過により未結合 FITC を除き、80% エタノール処理と生理食塩水 (PBS; 0.01 M リン酸緩衝液, pH 7.2, 0.85% NaCl) 洗浄をほどにした健全オオムギ、タバコとダイコン葉のアセトン粉末処理 (37℃, 60分と7℃, 一夜) により非特異的抗体を除去した。FITC 結合抗体は PBS で希釈した後、0.01% Na_3N を加え冷蔵庫に保管した。

プロトプラストのウイルス感染の検定は以下のように行った。⁷⁸⁾ プロトプラスト懸濁液を少量、50% 卵白アルブミン溶液を薄くぬったスライドガラス上に置き、ベアドライヤーで即座に乾燥させ、はりつけた。プロトプラストは90~95% エタノール、10分の処理で固定した後、PBS で10分間洗浄した。プロトプラスト試料部以外の PBS をろ紙で除いた後、試料上に少量の蛍光抗体を乗せ、37℃, 30~60分、あるいは7℃, 一夜

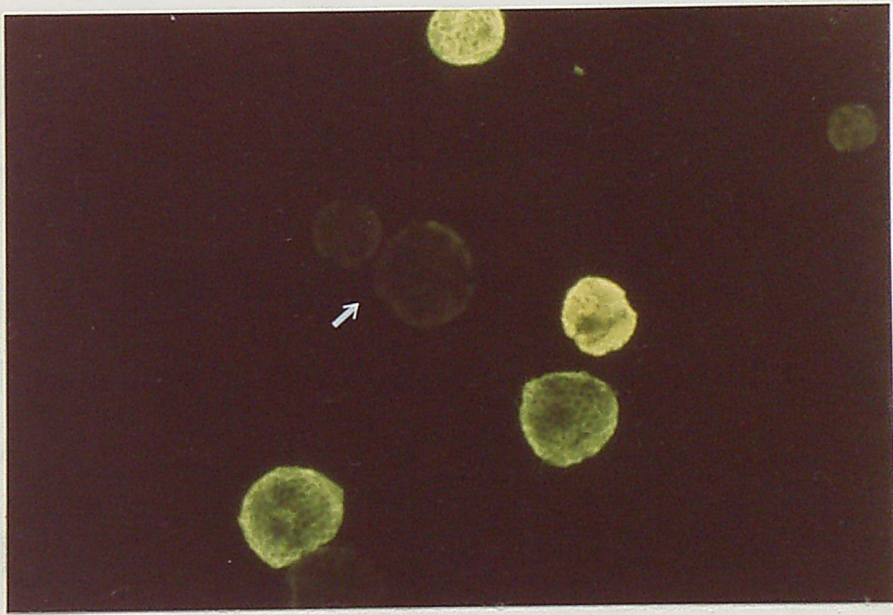


図3 BMV特異蛍光抗体染色されたオオムギプロトプラストの蛍光顕微鏡写真
接種44時間後に染色。矢印は非感染プロトプラスト。

反応させた。PBS 15 分の洗浄で未吸着の蛍光抗体を除いた後、50% 無蛍光グリセリンで包埋し、蛍光顕微鏡で観察した。(図 3)。

結 果

イオン強度 B M V 粒子が強い正電荷を持つような低い pH でプロトプラストに接種した場合、緩衝液濃度が低くなるにともなって感染率は増加した (表 7, 実験 1)。リン酸緩衝液よりクエン酸緩衝液のほうが高濃度での感染阻害度は大きかったが、pH 5.0 の 0.1 mM クエン酸緩衝液を用いたとき、プロトプラストは最も高率に B M V に感染した。イオン強度の感染に及ぼす影響をさらにくわしく調べるため、異った濃度の中性塩を含む 0.1 mM クエン酸緩衝液、pH 5.0 で接種を行った。その結果、塩濃度が高まるに伴って感染は強く阻害されることがわかった (表 8)。その阻害度は一価性の KCl より二価性の $MgCl_2$, $CaCl_2$ でより強く、10 mM の $MgCl_2$ ある。

表7 オオムギプロトプラストのBMV感染
に及ぼす緩衝液濃度の影響^{a)}

実験	緩衝液	pH	緩衝液 濃度 (mM)	感染率 ^{b)} (%)
1	Citrate	5.0	0.1	61
			1	50
			5	39
			10	13
			10	13
	Phosphate	5.4	1	47
			5	40
			10	37
			10	37
2	Tris-HCl	8.8	1	- ^{c)}
			5	8
			10	10
			25	19
			50	8
			50	8
3	Phosphate	8.8	1	- ^{c)}
			5	8
			10	11
			25	13
			50	26
			100	20

a) 接種条件: 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BMV, 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ポリオルニチン, 前処理なし (実験1),
1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BMV, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ポリオルニチン, 前処理5分 (実験2と3)。

b) 接種44時間後, 蛍光抗体法により判定。

c) 接種処理時にプロトプラストが凝集。

表 8 オオムギプロトプラストの BMV 感染
に及ぼす中性塩度の影響^{a)}

濃 度 (mM)	KCl	MgCl ₂	CaCl ₂
0	52 ^{b)}	52	52
0.5	49	39	15
1	45	30	13
10	19	0	0

a) 接種条件: 20 $\mu\text{g/ml}$ BMV, 0.2 $\mu\text{g/ml}$ ポリオルニチン, 0.1 mM クエン酸緩衝液, pH 5.0, 前処理なし。

b) 数値は 接種 44 時間後の蛍光抗体法による感染率(%)。

は CaCl_2 の存在下では感染はまったく起らなかった。

それとは逆に、BMV 粒子が負に荷電している pH 8.8^{*}でのポリオルニチンに依存する感染様式では、リン酸緩衝液とトリス塩酸緩衝液を用いた場合、それぞれ 1 mM から 50 mM あるいは 25 mM に濃度が高くなるにもなって感染率は増加した（表 7, 実験 2 と 3）。ただし、それより高い濃度では、いずれの緩衝液でもわずかに感染率は減少した。高 pH の接種区では、緩衝液濃度が 5 mM 以下になると、しばしば接種処理中にプロトプラストが互いに凝集を起し、破損することがあった。

pH 値 0.1 mM クエン酸あるいは 1 mM リン酸緩衝液を用いて 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BMV を接種した場合、感染率は pH を下げるほど増加した（表 9, 実験 1）。このポリオルニチン非依存性の感染様式では、pH 値が 6.6 以上になると感染はまったく起らなかった（表 9,

* BMV の等電点は pH 7.9⁹⁾

実験1)。高い濃度のBMV (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を接種源とした場合はpHを5.0以下に下げても感染はほとんど影響されなかったが、低い濃度のBMV (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で接種すると、pHを5.1から4.2に下げるに伴って感染は増加した(表10)。

一方、ポリオルニチンに依存する感染様式では、50 mM リン酸あるいは25 mM トリス塩酸緩衝液でpHを6.6から8.8へ、8.0から8.8へそれぞれ上げるに伴って感染率は増加した(表9, 実験2と3)。ただし、それより高いpHでは感染率はむしろ減少した。

ウイルス濃度 ポリオルニチン非依存性の感染様式では、BMV濃度を1から50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に高めるにともなって、ポリオルニチンの有無にかかわらず感染率は増加し、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でほぼ飽和状態に達した(表11, 実験1)。

一方それとは対照的に、ポリオルニチン依存性の感染様式では、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BMVが最適でそれ以上でも以下でも感染率は減少した(

表9 オオムギプロトプラストのBMV感染
に及ぼすpHの影響^{a)}

実験	緩衝液	緩衝液 濃度 (mM)	pH	感染率 ^{b)} (%)
1	Citrate	0.1	4.4	62
			4.7	62
			5.0	61
			5.3	57
			5.6	47
	Phosphate	1	5.4	51
			5.6	49
			5.8	39
			6.0	24
			6.2	20
			6.4	8
			6.6	0
			6.8	0
2	Phosphate	50	6.6	1
			7.0	7
			7.4	20
			7.8	27
			8.2	48
			8.8	63
3	Tris-HCl	25	8.0	19
			8.8	31
			9.5	12

a) 接種条件: 20 μ g/ml BMV, 0.2 μ g/ml ポリオルニチン, 前処理なし (実験1),
1 μ g/ml BMV, 1 μ g/ml ポリオルニチン, 前処理2.5分 (実験2と3)。

b) 接種44時間後, 蛍光抗体法により判定。

表10 オオムギプロトプラストのBMV感染
に及ぼす異ったBMV濃度接種におけ
るpHとポリオルニチンの影響

pH ^{a)}	BMV 濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	ポリオルニチン濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	
		0	0.2
4.2	5	14 ^{b)}	32
4.5		8	28
4.8		2	18
5.1		1	13
4.2	20	33	36
4.5		34	36
4.8		28	34
5.1		33	36

a) 0.1 mM ケン酸緩衝液。

b) 数値は接種44時間後の蛍光抗体法による感染率(%)。

表11, 実験2)。なお, この傾向はより高いpHでより顕著に認められた。

ポリオルニチン B M V 粒子が正に荷電しているような低いpHで接種した場合, 感染はポリオルニチンに依存せず高率に起った。しかし, ポリオルニチン非依存性の感染も, ポリオルニチンによりわずかに促進され, ウイルス濃度が低いときにその効果は特に顕著であった(表10)。またイオン強度, pHなどの条件が最適値からはずれた場合にも, ポリオルニチンによる感染促進効果は増大した。低いイオン強度, 低いpHの条件では, ポリオルニチンのプロトプラストに対する毒性が強く, $0.2 \mu\text{g/ml}$ 以上の濃度ではむしろ感染が阻害されることがあった。また, $1 \mu\text{g/ml}$ ポリオルニチンでは接種処理時にプロトプラストが互いに凝集を起こし, 破損することがあった。

B M V が負に荷電しているような高pHでの接種では, ポリオルニチンの存在はB M V

表11 オオムギプロトプラストのBMV感染
に及ぼすポリオルニチン存在, 非存在
下におけるBMV濃度の影響^{a)}

実験	pH	BMV 濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	ポリオルニチン濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	
			(0)	(0.2)
1	5.0	1	0 ^{b)}	19
		5	21	25
		10	26	37
		20	45	60
		50	43	63
			(0)	(1)
2	8.0	0.1	-	1
		0.5	-	15
		1	0	19
		5	0	13
	9.0	0.1	-	1
		0.5	-	16
		1	0	33
		5	0	8

a) 接種条件: 0.1 mM クエン酸緩衝液, 前処理なし(実験1),
25 mM トリス塩酸緩衝液, 前処理5分(実験2)。

b) 数値は接種44時間後の蛍光抗体法による感染率(%)。

感染にとって不可欠であった（表11, 実験2）。ポリオルニチン濃度を1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上にすると, しばしばプロトプラストが互いに凝集し破損したので, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を最適濃度として用いた。

TMVをはじめ接種条件下で負に荷電している多くのウイルスの場合, 接種前にウイルス粒子をポリカチオンと反応させることがプロトプラストのウイルス感染に不可欠である場合がある。¹⁰⁵⁾ この点についてBMV-オオムギプロトプラスト系の2つの感染様式で調べた結果を表12に示す。ポリオルニチン非依存性の感染様式では, BMV粒子をポリオルニチンで前処理すると, 感染率は処理時間に伴って減少し, まったく前処理しないときに最大の感染が得られた。それとは逆に, ポリオルニチン依存性の感染様式ではウイルス粒子をポリオルニチンで前処理することが感染にとって不可欠であった。しかし, 5分以上前処理すると, 感染率は減少し, 30分で

表12 オオムギプロトプラストのBMV感染
に及ぼすBMVのポリオルニチンによ
る前処理の影響^{a)}

前処理 ^{b)} (分)	感染率 ^{c)} (%)	
	実験 1	2
0	54	66
10	51	48
25	—	42
35	35	38
60	31	32
	実験 3	
	3	4
0	0	0
2.5	—	19
5	46	18
10	—	7
20	2	2
30	—	0

a) 接種条件; 20 μ g/ml BMV, 0.2 μ g/ml ポリオルニチン, 0.1 mM クエン酸緩衝液, pH 5.0 (実験 1 と 2), 1 μ g/ml BMV, 1 μ g/ml ポリオルニチン, 50 mM リン酸緩衝液, pH 8.5 (実験 3 と 4)。

b) 23°C

c) 接種44時間後, 蛍光抗体法により判定。

まったく感染が起らなかった。

ポリオルニチン依存性感染の接種条件下で B M V が実際にポリオルニチンと複合体を形成するかどうかを吸光度計で濁度を測定して調べた。pH 5.0 のクエン酸緩衝液では、B M V - ポリオルニチン複合体の形成は認められなかった。しかし、pH 6.0 以上の 50 mM リン酸緩衝液、または pH 6.2 以上の 25 mM トリス塩酸緩衝液では B M V - ポリオルニチン複合体が形成され、pH が高まるにともなって増加する傾向にあった (図 4)。pH 6.0 以上のリン酸緩衝液ではポリオルニチン単独でも凝集を起こすことは知られているが、トリス塩酸緩衝液ではそのような現象は見られなかった。pH 8.8 のリン酸緩衝液とトリス塩酸緩衝液のいずれの場合も 5 mM 以上で複合体が形成された。しかし、複合体形成の程度は必ずしも感染率の増減とは一致しなかった。

ポリアニオン プロトプラストのウイルス

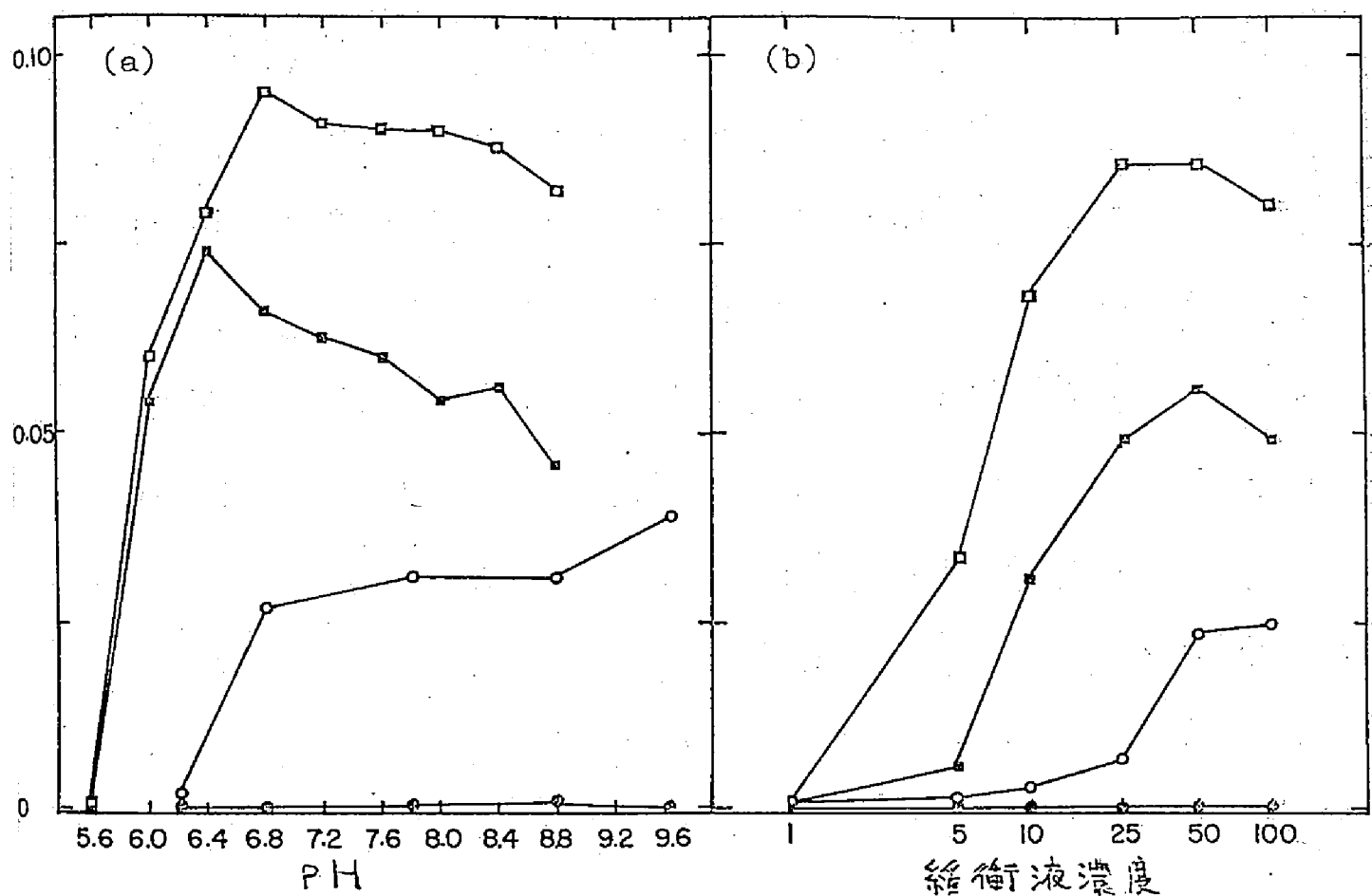


図 4 ポリオルニチン(20 μg/ml)単独 (□, ●) あるいは BMV(20 μg/ml) と混合 (□, ○) で 23°C, 30分培養後の 340 nm の吸光度

a) 50 mM リン酸緩衝液 (□, ○) と 25 mM トリス塩酸緩衝液 (●, ○)

b) pH 8.8

スによる感染において、ウイルス-ポリカチオン複合体が感染単位として作用するという意見がある。⁶¹⁾ BMVが負に荷電している場合はポリオルニチンと複合体を形成することは先に述べたが、BMVが正に荷電している条件下でBMV-ポリアニオン-ポリカチオン複合体が感染単位を形成し、感染効率を高めるかどうかについて調べた。0.1 mMあるいは10 mM クエン酸緩衝液、pH 5.0で、BMVはポリグルタミン酸（分子量18,000）やデキストラン硫酸（分子量～500,000）と複合体を形成した。しかし、表13に示すように、ポリオルニチンの有無にかかわらず、ポリアニオンの濃度が増加するにともなって感染率は減少した。

考 察

BMV粒子の等電点はpH 7.9である。⁹⁾ たがって、低いpHで接種された場合ポリオルニチンが感染に必須でないのはBMV粒子

表13 オオムギプロトプラストのBMV感染
に及ぼすポリアニオンの影響

実験	クエン酸緩衝液 (pH 5.0) 濃度 (mM)	ポリアニオン 濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Na-デキストラン 硫酸	ポリ-L-グルタミン 酸
1 ^{a)}	0.1	0	34 (16)	—
		0.002	34	—
		0.02	27	—
		0.2	20 (5)	—
2 ^{b)}	0.1	0	52	52
		0.01	29	48
		0.1	30	33
		1	2 (0)	10 (4)
	10	0	15	—
		0.1	8	—
		1	0	—

a) 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BMV, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ポリオルニチンとポリアニオンを 23°C で 10 分、
接種前に処理。

b) 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BMV, 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ポリオルニチンを a) と同様に処理。

c) 数値は接種44時間後の蛍光抗体法による感染率(%)。
括弧はポリオルニチン非存在下での接種。

自身が正に荷電しているためである。一方、高いpHでの感染がポリオルニチンに依存するのは、負に荷電したBMV粒子がポリオルニチンと複合体を形成してはじめて正に荷電されるためと考えられる。一般にプロトプラスト膜表面は負に荷電していることが知られている。³³⁾したがって、ポリオルニチン非依存性感染に及ぼすイオン強度とpHの影響(表7, 8と9)はウイルス粒子とプロトプラスト膜間の静電的引力作用、特にウイルス粒子の正電荷の強さが感染をコントロールしていることを示唆している。また、表10に示されたBMV濃度、ポリオルニチンとpHの感染に及ぼす影響より、感染がBMV粒子の持つ正電荷の強さ以外に、プロトプラストに作用する全正電荷量によっても規定されていることが明らかである。このことは、ポリオルニチン非依存性の感染がポリオルニチンにより促進されたにもかかわらず、ポリオルニチンとの前処理で感染が逆に阻害されたことから支持

された。

ポリオルニチン非依存性の感染で比較的高濃度のBMVが要求されるのは、BMV粒子自身の正電荷がBMV-ポリオルニチン複合体のそれより弱いことによるのであろう。このことはポリオルニチン依存性の感染が比較的高いイオン強度下で起こることからも推定される。

BMVはpH 6.6以上で少し膨脹したRNaseに感受性の不安定な型に変形することは知られて⁴²⁾いるが、そのようなpHでの接種では、RNaseの影響が感染に反映されるかもしれない。また、BMV-ポリオルニチン複合体の静電的性質も前処理中に変化することは十分考えられる。例えば、高いpHでBMVが負に荷電している接種条件では、ウイルス濃度を一定量以上に上げたり、pHを極端に高くするとむしろ感染効率が下がるのは、ウイルス-ポリオルニチン複合体の正電荷がウイルスの負電荷によりむしろ弱まったためで

あろう。

第2節 浸透圧変化の影響

プロトプラストのウイルス感染に対する溶液浸透濃度とその変化の影響については、今日までまったく何も知られていない。低濃度マンニトール溶液で分離されたプロトプラストが、高濃度で分離されたものに比べ、高率にBMVに感染することは第II章で述べた(表2)。本節では浸透濃度変化がプロトプラストのBMV感染に及ぼす影響についてさらにくわしく調べた。

方 法

分離したオオムギプロトプラストを遠心分離で集め、さらに2回マンニトール溶液で洗淨した(接種前洗淨)。0.2 mMクエン酸でpH 5.0に緩衝されたマンニトール溶液5 mlにBMVとポリオルニチンをそれぞれ40 μ g/mlと0.4 μ g/mlになるよう加え、ただちに、

マンニトール溶液で約 5×10^5 個/ml に懸濁したプロトプラストを等量加えた。室温で15分反応させた後、遠心分離でプロトプラストを集め、さらに2回10 mM CaCl_2 を含むマンニトール溶液で洗浄した（接種後洗浄）。

結 果

プロトプラストはマンニトール濃度が0.5 M以下では不安定なので、それ以上の濃度のマンニトール溶液を用いて実験を行った。プロトプラストは溶液浸透濃度が増加する変化（浸透圧増加ショック）には比較的安定であったが、その減少する変化（浸透圧減少ショック）には不安定で、しばしば一部のプロトプラストが凝集を起こし破損した。その破損プロトプラスト数は、とくに20～40 $\mu\text{g/ml}$ BMVが存在した場合に著しく増加した。しかし、凝集を起こさなかった残りのプロトプラストは培養に移しても他の場合と同様安定であった。

B M V 接種直前にプロトプラストを濃度の高いマンニトール溶液に懸濁して浸透圧増加ショックを与えると、感染率は非常に増加した（表14）。0.5 M マンニトールで分離、洗浄したプロトプラストを0.5 M から0.85 M マンニトールで接種した場合、感染率はマンニトール濃度が高くなるほど、すなわち、浸透圧増加ショックが大きくなるほど増加した（表14, 実験2）。それとは逆に、接種直前、あるいは接種前洗浄時に浸透圧減少ショックを与えると、感染はほとんど起らなかった（表14, 実験1）。しかし、接種前洗浄時における浸透圧減少ショックによる感染阻害効果は、接種直前に浸透圧増加ショックを与えると、かなり打ち消された（表14, 実験1）。接種後洗浄時における浸透圧ショックは接種前ほど感染に影響しなかったが、浸透圧増加ショックによる感染の促進は認められた（表14, 実験3と4; 表19）。一方、接種後洗浄時における浸透圧減少シ

表14 オオムギプロトプラストのBMV感染
に及ぼす浸透圧ショックの影響

実験	マンニトール濃度 (M)				感染率 (%)	
	分離	前洗浄	接種	後洗浄	23 (時間)	48
1	0.5	0.5	0.5	0.5	18	-
	0.5	0.5	0.7	0.7	50	-
	0.5	0.7	0.5	0.5	4	-
	0.5	0.7	0.7	0.7	25	-
	0.7	0.5	0.5	0.5	2	-
	0.7	0.5	0.7	0.7	25	-
	0.7	0.7	0.5	0.5	1	-
	0.7	0.7	0.7	0.7	15	-
2	0.5	0.5	0.50	0.50	6	16
	0.5	0.5	0.55	0.55	11	28
	0.5	0.5	0.60	0.60	11	45
	0.5	0.5	0.65	0.65	24	54
	0.5	0.5	0.70	0.70	39	63
	0.5	0.5	0.75	0.75	43	64
	0.5	0.5	0.80	0.80	44	61
	0.5	0.5	0.85	0.85	48	74
3	0.5	0.5	0.5	0.5	-	29
	0.5	0.5	0.5	0.7	-	38
	0.5	0.5	0.7	0.5	-	73
	0.5	0.5	0.7	0.7	-	72
	0.7	0.7	0.7	0.5	-	32
	0.7	0.7	0.7	0.7	-	24
4	0.5	0.5	0.5	0.5	-	42
	0.5	0.5	0.5	0.7	-	53
	0.5	0.5	0.7	0.5	-	70
	0.5	0.5	0.7	0.7	-	66

ックは感染阻害効果を持たなかった（表14, 実験4）。

浸透圧増加ショックのBMV感染促進に対する効果の時期をさらに詳細に調べるため、接種時と接種前後の洗浄時のさまざまな時期にマンニトール濃度を0.5Mから0.7Mに上げて感染に及ぼす影響を見た。接種直前より、プロトプラストとBMVを混合して少なくとも10分間までは浸透圧増加ショックによる感染促進効が強く認められたが、接種前および接種後洗浄時にはその効果は弱かった（表15）。

一方、タバコプロトプラスト-TMV系のようなポリカチオン依存性の感染系では浸透圧増加ショックの効果は認められなかった。しかし、BMVとタバコプロトプラストの関係では、オオムギの場合と同様その効果が認められた。

表15 オオムギプロトプラストのBMV感染
に及ぼす浸透圧増加ショック時期の影
響

時間 ^{a)} (分)	感染率 (%)
-10	50
-0.1	65
0	66
1	70
2	64
5	69
10	66
20	43
-	39

a) プロトプラストとBMVを混合したときを0分とした。
したがって、-10は接種前洗浄時を、20は接種後洗浄時を意味
する。(-)は浸透圧増加ショックを与えなかった場合。

b) 接種28時間後、蛍光抗体法により判定。

考 察

浸透圧とその変化のプロトプラストのウイルス感染に及ぼす影響を報告した論文は今までないが、細菌のプロトプラスト²²⁾や動物細胞^{48,49)}のウイルスRNAによる感染が浸透圧減少ショックで促進されることは知られている。

HeLa細胞-ポリオウイルスRNA系では、細胞を高張液から低張液に移すと細胞に吸着されたRNAがRNase sensitive から RNase resistant な状態になったことより、細胞をとりまく溶液が浸透圧減少ショックで細胞内に受動的に流入するときRNAも同時に取り込まれると考えられた⁴⁹⁾。BMV-植物プロトプラスト系では浸透圧ショックの影響は、第V章で述べるBMV RNA感染の場合を含め、これとは異なる。RNA感染と溶液浸透濃度の関係はRNase による影響で説明される(第V章)。BMV粒子による感染では、浸透圧ショックの膜構造とその性質に及ぼす影響を考慮する必要がある。おそらく、浸透圧増加ショック

がウイルス粒子のプロトプラスト膜への吸着、あるいは取り込みに都合の良いうように膜構造とその性質を変えたものと考えられる。

第3節 感染機構

植物プロトプラストのウイルス感染機構に關しては主にタバコプロトプラスト系を用いて数多くの研究がなされてきたが、2つの異った意見が主張されてきた。一つは、エネルギーに依存した細胞の能動的生理反応、いわゆる飲細胞運動37, 39, 40, 81)によるというもので、もう一つは、細胞膜の破損した部分にたまたま着いたウイルス粒子が膜が修復される過程14, 15)で物理的に細胞内へ取り込まれるというものである。

本節ではさまざまな条件でBMVをオオムギプロトプラストに接種して、透過型及び走査型電子顕微鏡を用いて觀察し、他の感染条件と合せてBMVの感染機構を考察する。

方 法

電子顕微鏡法 プロトプラストを2.5%グルタールアルデハイド, 0.2%タンニン酸と接種時と同じ濃度のマンニトールを含む0.05Mリン酸緩衝液 pH 6.8で一夜, 0℃で固定し, さらにタンニン酸濃度を2%に上げた同様の溶液で一夜, 0℃で固定した。このように前固定したプロトプラストを0.05Mリン酸緩衝液, pH 6.8で数回遠心分離で洗浄した後, 1%オスミック酸で一夜, 0℃で固定した。固定プロトプラストをイオン交換水で数回洗浄後, レンズ紙に包みエタノール濃度を順次上げて脱水した。なお, 一部のプロトプラストは走査型電子顕微鏡試料とするため, エタノールを順次イソアミル酢酸に置換し, 最終的に100%イソアミル酢酸に移した。試料は乾燥後, アルミニウム板上に散布し, 金で約300Åの厚さになるようにEIKOイオンコーターでコートし, 日立HS-2X型走査電子顕微鏡で観察した。エ

タノールで脱永した残りのプロトプラストは、透過型電子顕微鏡試料とするため、プロピオンオキサイドに移し、スプール低粘度包埋溶剤 (Polyscience Inc.) で包埋した。超薄切片 (約 500 \AA) は酢酸ウラニルで30分、さらにクエン酸鉛で30分染色し、JEM-7型透過型電子顕微鏡で観察した。タンニン酸を前固定で使わない場合は、2.5%グルタルアルデヒドで一晩、 0°C で固定し、その後は同様の処理で試料を作成した。

結 果

走査型電子顕微鏡観察 プロトプラストの表面構造と感染率との関係を調べるため、いくつかの典型的な感染条件を選んで接種を行った (表16)。非接種プロトプラストは表面にしばしば小さな球形の突出物構造が見られたが、それ以外のところは比較的なめらかであった (図5a)。一方、 1 mM クエン酸緩衝液、 $\text{pH } 5.0$ を用いて $20 \text{ }\mu\text{g/ml}$ BM

表16 オオムギプロトプラストの接種条件と外部形態^{a)}

緩衝液	緩衝液濃度 (mM)	pH	ポリオレフィン 濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	BMV 濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	CaCl_2 濃度 (mM)	感染率 ^{b)} (%)	倍率	図 ^{c)}
クエン酸	0.1	5.0	0	0	0	0	8,000	a
クエン酸	0.1	5.0	0.2	0	0	0	8,000	b
クエン酸	0.1	5.0	0	20	0	45	8,000	c
クエン酸	0.1	5.0	0.2	20	0	55	8,000	d
リン酸	1	7.0	0.2	20	0	0	8,000	e
クエン酸	0.1	5.0	0.2	20	10	0	8,000	f
クエン酸	0.1	5.0	0.2	20	0	55	8,000	g
クエン酸	0.1	5.0	0.2	20	0	55	16,000	h

a) 分離: 0.6 M マンニトール .

接種: 0.7 M マンニトール

b) 接種44時間後, 蛍光抗体法により判定。

c) 図5参照。

Vを接種した場合、接種時のポリオルニチンの有無にかかわらず、プロトプラスト表面全体にウイルス様粒子が吸着されているのが観察された(図5c, d, gとh)。このようなウイルス様粒子はポリオルニチンだけで処理されたプロトプラスト表面に見られなかった(図5b)。10 mMクエン酸緩衝液、pH 5.0を用いた場合は、0.1 mMのときに比べプロトプラスト表面に吸着されたウイルス様粒子は減少した。1 mMリン酸緩衝液、pH 7.0を用い20 μ g/ml BMVで接種しても、プロトプラスト膜表面構造は非接種区と区別がつかず、ウイルス様粒子もまったく認められなかった(図5e)。BMV感染を完全に阻害する濃度の CaCl_2 下で接種された場合にも、プロトプラスト表面にウイルス様粒子はほとんど見られなかった(図5f)。またカルシウム処理したプロトプラストでは膜全体が収縮したように見えた(図5g)。

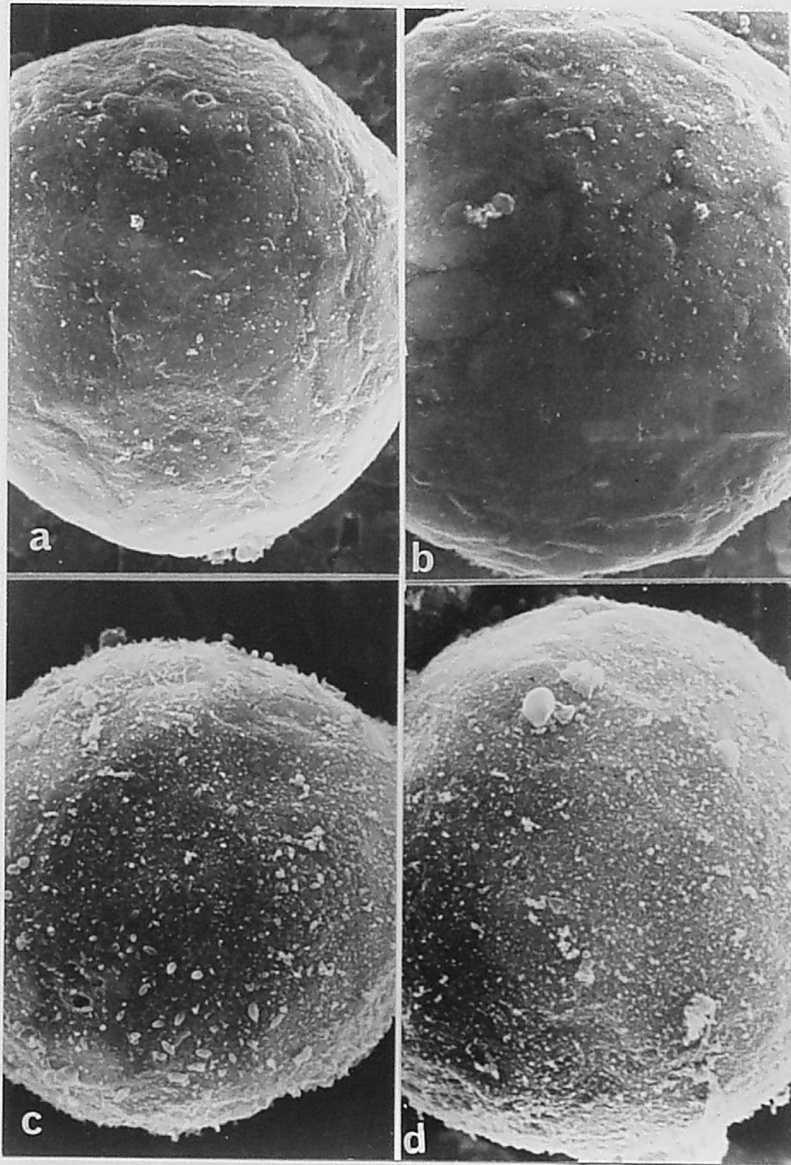


図 5 オオムギフロトプラストの走査電子顕微鏡写真
接種条件は表16参照 (×8000)

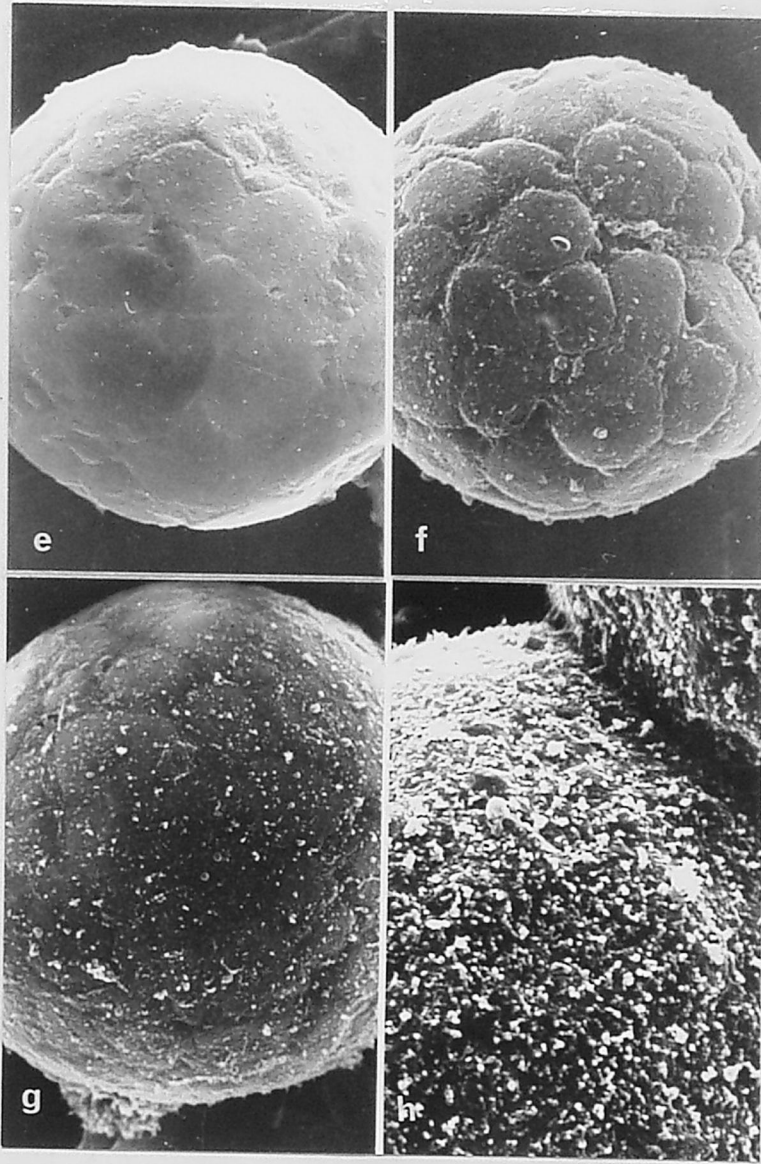


図 5 オオムギフロトプラストの走査電子顕微鏡写真

接種条件は表 16 参照 (× 8000)

透過型電子顕微鏡観察

0.1 mM グイン酸緩衝液, pH 5.0 で 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BMV を接種した場合, ポリオルニチンの有無にかかわらずプロトプラスト膜表面全体にウイルス粒子が観察された (図 6 a, b と c)。ウイルス粒子の大半は膜表面にゆるく付着していたが, 一部の粒子は膜に密接に吸着され, そのような場合にのみ細胞膜が陥入している像が観察された (図 6 b と c)。10 mM CaCl_2 存在下, あるいは pH 7.0 で接種したときは, 膜表面に付着しているウイルス粒子数は非常に少なく, ウイルス粒子が膜に強く吸着されているような像はまったく認められなかった。

前固定の際, タンニン酸を使用しなかった場合には, プロトプラスト膜表面に付着したウイルス粒子は固定されず, ただ細胞膜陥入部位とその結果生じたと思われる細胞内小胞にのみウイルス粒子が認められた (図 7)。飲細胞運動的細胞膜陥入とその結果生じたと思われる小胞が, BMV 感染において重要な

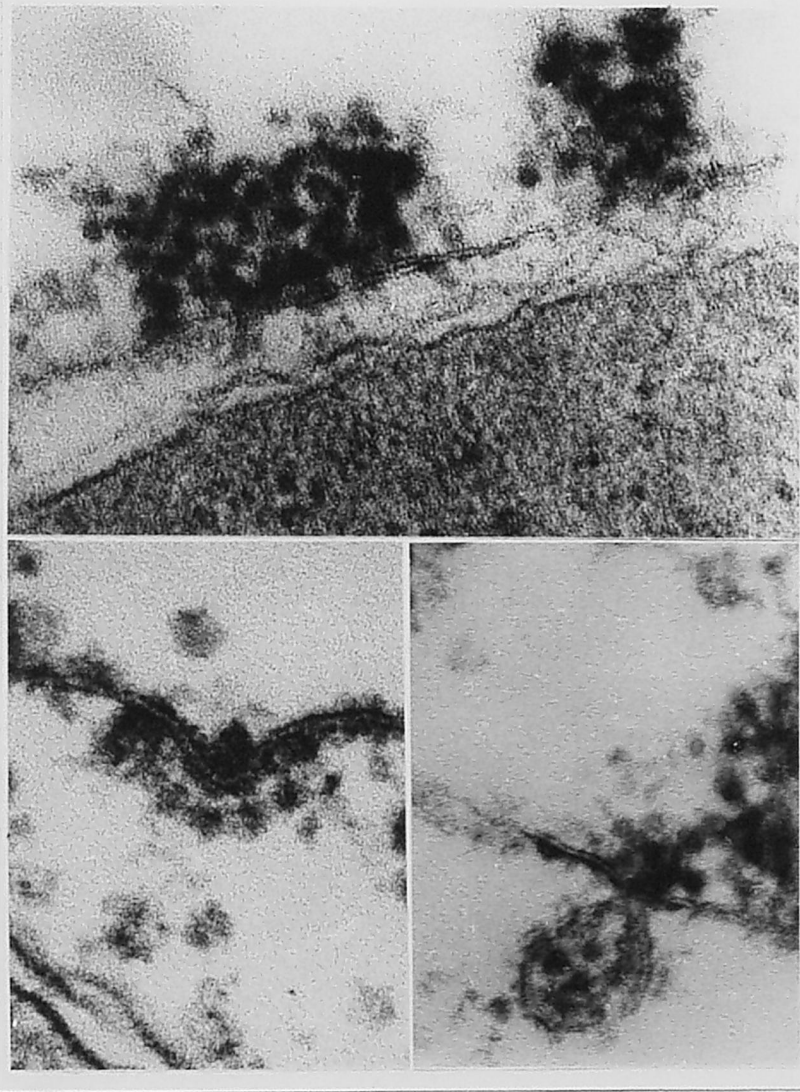


図 6 の BMV 接種 オオムギプロトプラストの電子顕微鏡写真 (X200,000)
 接種条件: 20 μ g/ml BMV, 0.1 M フェン酸緩衝液 pH 5.0, 0.7 M
 マンニトール; プロトプラストの分離は 0.6 M マンニトール。
 図 5, C と同一資料。

役割を持つかどうかをよりくわしく知るため、浸透圧増加あるいは減少ショックを与えて接種したプロトプラストの超薄切片像を比較した。その際プロトプラストは、 0.1 mM クエン酸緩衝液、 $\text{pH } 5.0$ で $20\text{ }\mu\text{g/ml}$ BMV を 10 分間接種し、直ちにグルタールアルデハイドだけで固定した。浸透圧増加ショック ($0.5\text{ M} \rightarrow 0.7\text{ M}$) を与えたプロトプラストの感染率は 86% で、逆の浸透圧ショックを与えた場合は 3% であった。ウイルス粒子を伴った細胞膜陥入と細胞内小胞は、浸透圧増加ショックを与えた場合にのみ観察された (図 7)。なお、^{14,15} Burgess がタバコプロトプラストをポリオルニチン ($1\text{ }\mu\text{g/ml}$) 存在下で TMV 接種したときに観察したウイルス粒子を伴った細胞膜破損部位はいずれの場合にも観察されなかった。

感染の成立 接種時にカルシウムイオンが存在すると BMV 感染は阻害されるが、接種後洗浄時にはカルシウムイオンがむしろ

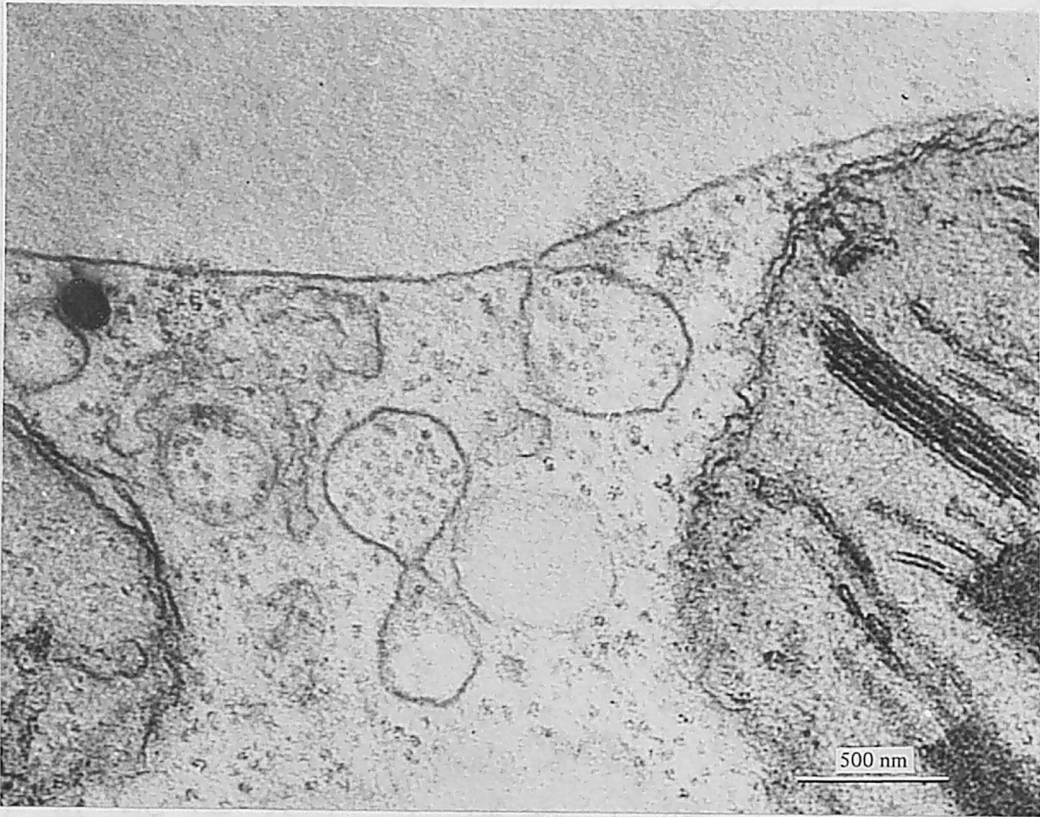


図 7 BMV接種 オオムギプロトプラストの電子顕微鏡写真

接種条件: 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BMV, 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ポリオルニチン, 0.1 mM クエン酸緩衝液, pH 5.0, 0.7 M マンニトール; プロトプラストの分離は 0.5 M マンニトール。

前固定: タンニン酸を含まない。

感染を促進した（表 17）。感染初期過程におけるカルシウムイオンの影響をさらにくわしく調べるため、 CaCl_2 を与える時期を変えて接種を行った。感染率は CaCl_2 を与える時期を遅らせるにともなって増加し、5 分後にはその阻害効果はほとんどなかった（図 8）。接種時の pH を中性にすると B M V 感染は阻害されるが、pH 変化の影響もカルシウムイオンの場合とほぼ同様であった（図 8）。ただし、接種後洗浄を pH 7.0 のマンニトールで行っても感染が促進されることはなく、むしろむしろ確実に阻害された。

B M V 感染は 0°C で接種を行っても、 20°C あるいは 25°C と同様、高率に起った。このことはカルシウムイオンあるいは pH の中性化による阻害を受けない状態まで 0°C で感染過程が進行したことを意味している。

考 察

ポリカチオンに依存したウイルス感染系で

表17 接種後洗淨時におけるカルシウムイオンによるオオムギプロトプラストのB
MV感染の促進^{a)}

CaCl ₂ 濃度 (mM)	感染率 ^{b)} (%)
0	47
0.1	63
1	70
10	74

a) 接種プロトプラストを遠心分離で集めた後、果った濃度のCaCl₂を含む0.7Mマニトールで2回洗淨した。

b) 接種44時間後、蛍光抗体法により判定。

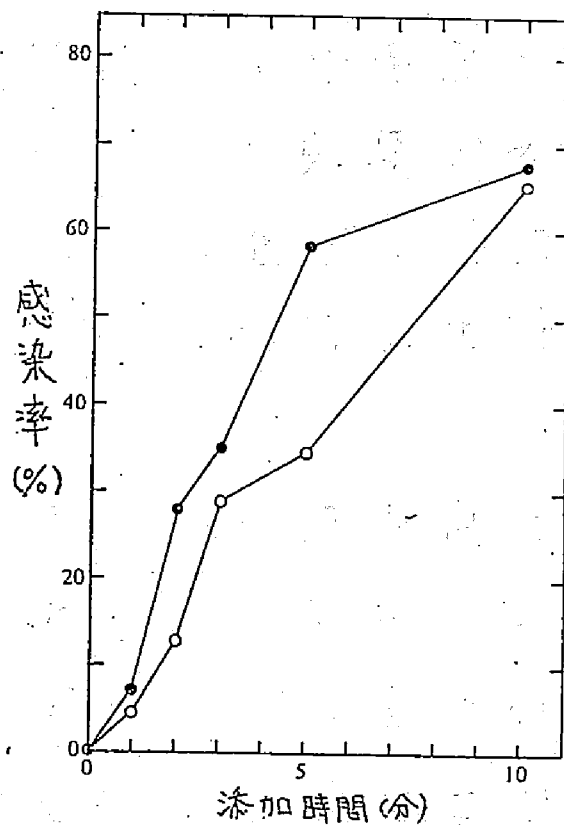


図 8 CaCl_2 添加と pH 変移のオオムギプロトプラストの BMV 感染に及ぼす影響

CaCl_2 (○—○) とリン酸緩衝液, pH 7.2 (●—●) を最終濃度がそれぞれ 10 mM と 2 mM になるよう接種時のさまざまな時間に加えた。感染率は接種 44 時間後に蛍光抗体法により判定。

は、ウイルスとプロトプラスト以外にウイルスとポリカチオンあるいはポリカチオンとプロトプラスト間の相互作用も感染に影響する要因として考慮しなければなら¹⁰⁵⁾ないので、感染機構の解析はかなり困難である。一方、低いpH、低いイオン強度でのB₁M₂V感染はポリカチオンに依存せずに非常に高率に起こるので、感染機構の解析に比較的適した系である。

プロトプラストの前固定にグルタールアルデヒドとともにタンニン酸を使用することで、プロトプラスト表面に付着しているウイルス粒子がそのまま固定され、その量を判定することができるようになった。その結果、感染が高率に起こる条件と多くのウイルス粒子が膜に付着する条件は一致することがわかった。感染はカルシウムイオンの阻害実験(図8)より、プロトプラストとウイルスを混合してから5分ですでに成立していることが明らかになった。したがって、膜にゆるく付

着したウイルス粒子は直接感染には関与せず、膜に強く吸着した一部の粒子だけが飲細胞運動的細胞膜陥入を誘導し、その小胞化により感染が成立すると思われる。しかし、非生理的溫度（ $0 \sim 4^{\circ}\text{C}$ ）でも感染は高率に起こることより、これらの飲細胞運動的感染過程が動物細胞で見られるようなエネルギーに依存した生理的現象⁸¹⁾とは考えにくい。また、細胞膜の破損部位からウイルス粒子が取り込まれる像も観察されなかったので、Burgess^{14,15)}らの主張するような物理現象とも考えられない。細胞膜の構造とその機能についてはまだ大部分が未知であり、その詳細についてはわからないが、少なくとも正に荷電したウイルス粒子が吸着した部位では細胞膜陥入とその小胞化を誘導する何らかの変化が生じるものと考えられる。また、ウイルス粒子が強く吸着する部位とそうでない部位があるのは、細胞膜にも特に負電荷の局在した部位のあることを示唆している。カルシウムイオンが膜安定化イオ

ンであり、細胞膜を収縮させることを考えると、いったん細胞膜の陥入が起こった場合、カルシウムイオンがその小胞化を促進し、感染を成立させると考えられる。

第四章 プロトプラスト系と植物体レベル でのBMV感染の比較

植物ウイルス学においてプロトプラスト系の果す役割は非常に大きい。しかし、遊離プロトプラストは細胞壁を持たず、本来の植物組織における状態とは物理的にも生理的にも異なる。例えば、ダイコンは植物体レベルではBMVを接種されても感染しないが、ダイコンプロトプラストは *in vitro* でBMVを接種されると感染し、ウイルス増殖が起こった。²⁹⁾ 本章では、そのような現象をさらにくわしく調べた。

方 法

ダイコンへのBMVの接種は以下のように行った。i) カーボランダム (700メッシュ) を葉の両面に散布し、1~10 mg/ml のBMV溶液を綿棒で葉にこすりつけた。ii) BMV溶液 (5 mg/ml) を茎軸と葉柄より注射器を用いて植物体に注入した。iii) 裏表皮をはいで葉肉

細胞を露出させ、カーボランダムを含んだBMV溶液を噴霧した。BMV接種葉は接種後2日毎に切り取り、その一部よりプロトプラストを分離して蛍光抗体法で感染細胞の有無を検定し、残りの葉は乳ばちで摩砕しBMVの感染性を*C. hybridum* で生物検定した。表皮細胞でのウイルス感染の蛍光抗体法による検定は以下のように行った。⁶⁹⁾プロトプラスト分離のため、はいたBMV接種葉裏表皮を100%アセトンで15分固定した。生理食塩水(PBS)で30分洗浄後、はがれた側を上にして、卵白アルブミンをうすく塗ったスライドガラスに張りつけ、1%セルラーゼ溶液で28℃、30分処理した。PBSで30分洗浄後、BMV特異蛍光抗体で35℃、30分染色した。PBSで30分洗浄後、50%無蛍光グリセリンで包埋し、蛍光顕微鏡で観察した。

結 果

ダイコンの子葉期から十分成熟した植物体にいたるまで、接種葉と新葉いずれにおいても、BMV感染は分離プロトプラストの蛍光抗体法及び生物検定法では検出されなかった。また、いずれの葉位の葉にも病徴は見られなかった。一方、BMVの全身病斑植物であるオオムギのBMV接種葉1葉の葉肉細胞では、接種2日後に10%、4日後には約50%が感染していた。

BMVの増殖をダイコンとオオムギのプロトプラストで比較した結果を図9に示す。BMVの感染性は接種後遅くとも9時間で検出され、その後どちらのプロトプラストでも平行して増加し、最終的なプロトプラスト当りのBMV増殖量にはほとんど差が認められなかった。

プロトプラストへの接種ではそれぞれの細胞に直接ウイルスが取り込まれるが、植物葉の場合は表皮細胞だけが直接ウイルスの侵入

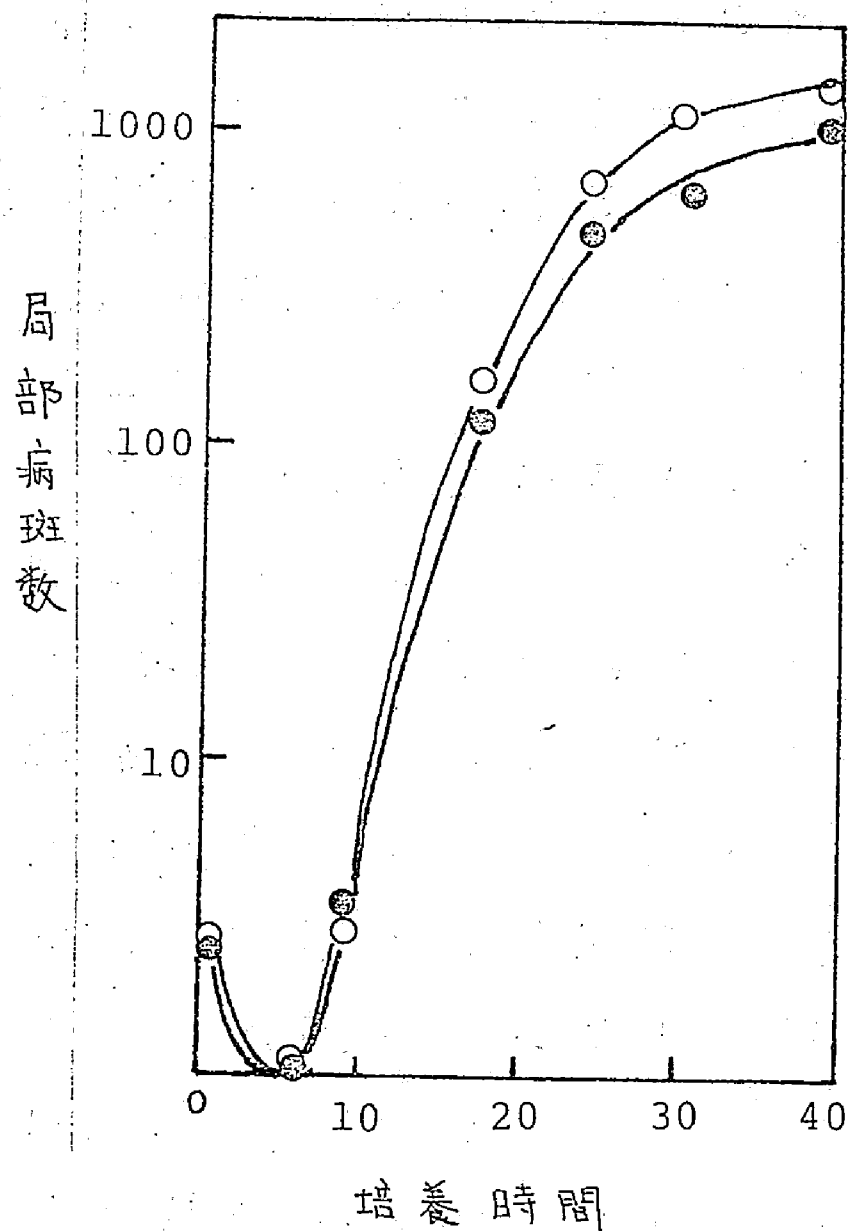


図 9 ダイコンプロトプラスト (●-●) とオオムギプロトプラスト (○-○) における BMV 増殖曲線

縦軸は 10 枚の *Chenopodium hybridum* 葉上の総病斑数。

を受けるものと考えられる。しかし、“方法”のii)とiii)で述べた処理では、BMV感染は検出されなかった。そこで表皮系細胞でのBMV感染の成否を蛍光抗体法により検討した。その結果、非常に少数であるが、BMV特異蛍光抗体に染色される細胞が認められた(図10)。蛍光の強度は接種2日目では弱い、その後強くなる傾向があった。蛍光細胞数は全観察細胞数の約0.05%で、接種後8日目までの観察ではその数は変化しなかった。一方、タバコ表皮とTMVの関係では、接種2日目でかなりの数の表皮細胞に感染が認められ、その数は接種4日後で10%に達し、その後も増加しつづけた。

タバコも植物体レベルではBMVに感染しなかったが、プロトプラストにすると高率に感染し、BMV増殖を維持した。しかし、タバコ表皮系でのBMV感染細胞の検出は失敗に終わった。

BMVの局部病斑植物の一つである *C. hybridum*

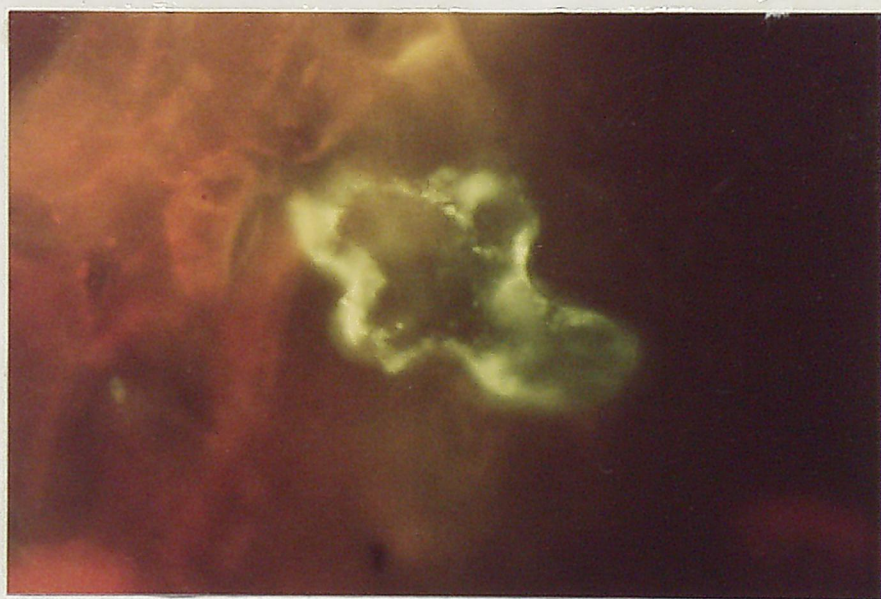


図10 BMV接種ダイコン表皮細胞の蛍光顕微鏡写真

中央にBMV特異蛍光抗体染色細胞が見られる。
BMV接種7日後の表皮。

よりプロトプラストを分離し、*in vitro*でBMV接種を行うと、高率に感染してウイルスの増殖を維持した。なお、その場合には植物体レベルで見られるような細胞死は伴わなかった。

考 察

植物ウイルスは一般に原形質連絡系を通じて細胞から細胞へ移行すると考えられている。^{23, 86)} BMVを接種されたダイコン葉組織では、このような移行が何らかの理由で不可能なため、ウイルス感染が進行しないものと考えられる。また、ダイコン葉組織をプロトプラストにすると、組織レベルで働いていたウイルス増殖を抑制するある種の制御がはずれ、BMVの増殖が可能になったとも考えられる。いずれにしても、このことは、自然界ではBMV感染の起り得ない細胞でも、プロトプラストにすると感染が可能になったことを意味している。一般に、組織レベルではウイルス感染に対して不死を起すような植物-ウイルスの組合せ

でも、プロトプラスト系では細胞死は伴わず、全身病斑植物より分離したプロトプラストと同様にウイルス増殖⁸⁰⁾が起る。また、同様の現象が高張液処理で原形質分離を起した葉組織でも起ることが明らかになった¹⁸⁾。したがって、この場合はプロトプラスト化ということよりも原形質分離という現象が重要な役割を演じていると思える。

本吉と大島は遺伝子支配のはっきりしているTMV抵抗性トマトとTMV感染の関係をプロトプラスト系で解析した^{66, 67)}。その結果、 T_m -1遺伝子をホモに持つ場合にのみプロトプラストでも抵抗性を示した。このように、植物体レベルとプロトプラスト系で同時にウイルス抵抗性の現象を調べ、どのレベルで抵抗性が発現されるかを解析していくことは、植物病理学的にも重要であり、植物-ウイルス間の相互作用の研究にも重要な糸口を与えるものである。

第Ⅴ章 プロトプラストのB M V・RNAによる感染

今日まで多くのウイルスによるプロトプラストへの接種実験が行われ、その条件についてはそれぞれの系でかなりくわしく研究されてきた。^{105, 106)}一方、ウイルスRNAによるプロトプラストへの接種条件に関しては、^{2, 8, 62, 92)}わずかの研究しかなされてい^{ない}。プロトプラスト系でウイルスRNAを接種源として用いることは、B M Vのように核蛋白質レベルで各構成粒子を分離することが困難な多分節ゲノムを持つウイルスの研究に、きわめて有効な手段を提供する。

本章では、プロトプラストのウイルスRNAによる感染に及ぼす溶液浸透濃度の影響をB M V粒子による感染の場合と比較し、RNA感染に影響するいくつかの因子について述べる。

材料 と 方法

ウイルス RNA の調製 ライルス RNA
は純化された BMV と TMV 粒子よりフェノール - SDS (ラウリル硫酸ナトリウム) - ベントナイト法³⁸⁾により分離した。なお、TMV の純化は BMV と同様に行い、純化ウイルスは 0.01 M リン酸緩衝液、pH 7.0 に懸濁し、 -20°C で凍結保存した。ライルス溶液 (5 mg/ml) に等量の RNA 抽出溶液 (2% SDS, 0.3% NaCl と 0.001 M EDTA を含む 0.03 M トリス塩酸緩衝液、pH 7.8) を加え、さらにそれに等量の氷飽和フェノールを加え、室温で 15 分間激しく振とうした。10,000g, 15 分の遠心分離で氷層部分を分離し、再びその氷層部分と等量の氷飽和フェノールを加え、同様の振とうと遠心分離後、再び氷層部分を得た。そこへ -20°C で冷したエチルエーテルを加え振とう、静置後、エーテル層を除き、この操作を 3~5 回繰り返した。その氷層部分に 2~2.5 倍量の -20°C に冷したエタノールを加え、 -20°C で 3

～5時間あるいは一夜放置した後、遠心分離でRNAを集めた。RNAはイオン交換水あるいは0.002 M-EDTAを含む0.04 Mトリス酢酸緩衝液、pH 7.8に溶かし、0℃で保存し、2日以内に接種実験に用いた。

プロトプラストへの接種 プロトプラストへのウイルスRNAによる接種はBMV粒子による接種操作と同様に行った。ただし、RNAの調製から接種にいたるまで用いる器具はすべて150℃、1時間以上の乾熱処理あるいは2% SDS溶液で60～80℃、30分の処理でRNaseを不活化したものを用了。

結 果

溶液浸透濃度の影響 プロトプラスト分離・接種時を通してのマンニトール濃度のBMV RNAおよびBMV粒子の感染に対する影響を図11に示す。マンニトール濃度がオオムギプロトプラストの安定性を保つ最低の

0.5 M のとき、BMV RNA による感染は最大であった。マンニトール濃度を増加するとともに、RNA 感染は急激に減少したが、BMV 粒子による感染はほとんど影響を受けなかった。接種直前の浸透圧増加ショックの RNA 感染に対する影響は BMV 粒子の場合とまったく逆であり、接種時のマンニトール濃度を 0.5 M からそれぞれ 0.6, 0.7, 0.8 M に高めるに従って RNA 感染は減少した(図 12)。表 18 に示されるように、RNA 感染にとって問題となるのは、接種時におけるマンニトール濃度変化による浸透圧ショックではなく、プロトプラスト分離・接種時を通してのマンニトール濃度であることが明らかになった。しかし、接種後のプロトプラスト洗浄時にマンニトール濃度を高めると、BMV 粒子による感染と同様 RNA 感染もわずかに促進された(表 19)。プロトプラストと RNA を混ぜてからマンニトール濃度を上げるまでの時間を変えた場合、その時間が長

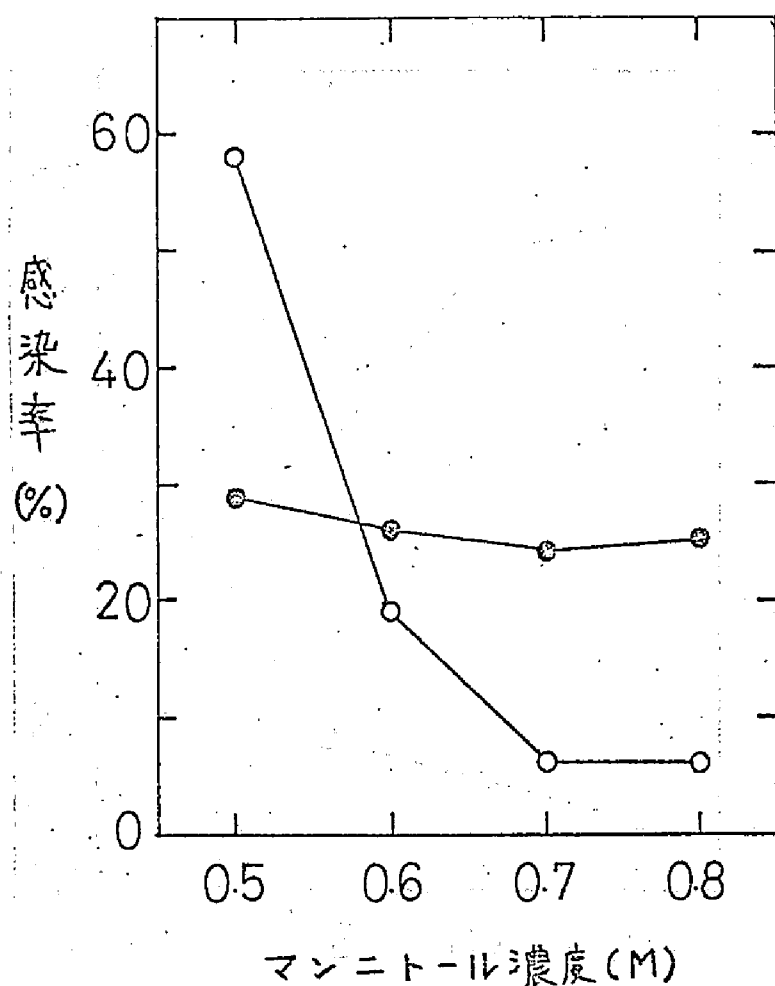


図 11 オムギプロトプラストの分離・接種時を通してのマンニトール濃度の BMV RNA (○-○) と BMV (●-●) 感染に及ぼす影響

BMV RNA の接種条件: 0.25 $\mu\text{g/ml}$ BMV RNA, 1 $\mu\text{g/ml}$ ポリオ
ルニテン, 10 mM グルタミン酸緩衝液, pH 5.0, 0°C, 15 分.

BMV の接種条件: 第 III 章, 第 2 節参照.

感染率は接種 27 時間後に蛍光抗体法により判定.

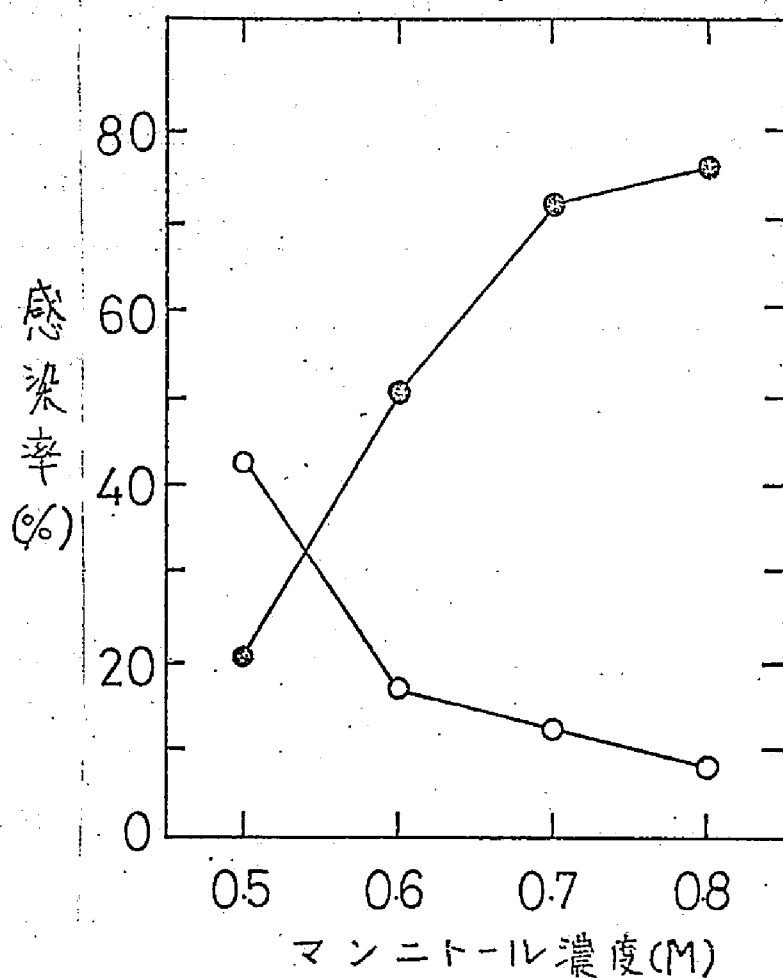


図 12 接種直前の浸透圧増カショックのオオムギプロトプラストの BMV RNA (○—○) と BMV (●—●) 感染に及ぼす影響

接種条件は図 11 を参照。

感染率は接種 44 時間後に蛍光抗体法により判定。

表18 オオムギプロトプラスト分離・接種時の
マンニトール濃度のBMV RNA感
染に及ぼす影響^{a)}

マンニトール濃度 (M)		感染率 (%)
分離	接種	
0.5	0.5	58
0.5	0.7	36
0.6	0.6	19
0.6	0.8	11
0.7	0.7	7
0.7	0.5	12
0.8	0.8	7
0.8	0.6	7

a) 接種条件は図11を参照。

表19 オオムギプロトプラストのBMV RNA
AとBMV粒子による感染に及ぼす接
種後洗浄時における浸透圧増加ショッ
クの影響^{a)}

マニトール濃度 (M)		接種源	
分離と接種	接種後洗浄	BMV	BMV RNA
0.5	0.5	38 ^{b)}	29
0.5	0.6	42	31
0.5	0.7	53	46
0.5	0.8	55	45

a) 接種条件; 0.8 μ g/ml BMV RNA, 1 μ g/ml ホリオルニチン, 20 mM グイン酸緩衝液, pH 5.0, 0°C, 15分。BMVの接種は第三章, 第2節参照。

b) 数値は接種44時間後の蛍光抗体法による感染率(%)。

くなるほどの感染阻害効果は弱まり、接種後洗浄時には逆に浸透圧増加ショックが感染を促進した。この現象はBMV粒子による感染に対するカルシウムイオンの効果と類似している（第三章，第3節）。RNAによる感染の成立時期を調べるため、接種時にすい臓RNase Aを外生的に加え、RNA感染に及ぼす影響を調べた。RNaseによる感染阻害度は加える時間を遅らすほど弱くなり、プロトプラストとRNAを混合して15分後にはほとんどのRNAがRNaseに対して安定な状態になって、感染が成立していることが明らかになった（表20）。

一般に植物プロトプラストを高張液で培養するとRNaseが^{2, 84)} *de novo*に合成され、細胞中のRNase活性が高まること、またプロトプラスト分離前にリジンやシクロヘキシミドで植物葉を処理しておくと、RNase活性の増高が抑制⁹³⁾されることが知られている。実際、リジンあるいはシクロヘキシミド存在下で分離したオ

表20 オオムギプロトプラストのBMVRNA
A感染に及ぼすRNase処理時期の影響^{a)}

処理番号	RNase添加 ^{b)} 時間(分)	温度 (°C)	
		0	20
1	-10	0 ^{c)}	0
2	0	-	2
3	2	12	-
4	5	28	6
5	8	29	-
6	10	33	4
7	15	56	15
8	未処理	70	23

a) 接種条件は表26を参照。

b) プロトプラストとBMVRNAを混合したときを0分とした。処理番号1では接種前洗浄時に、処理番号2~7では接種時に、それぞれ最終濃度が5 μ g/mlになるようRNaseを加えた。また処理番号5~7の場合のみ5 μ g/ml RNaseを含む0.7M マンニトールで接種後洗浄を行った。すべてのプロトプラストはRNaseを含まない培養液で培養した。

c) 数値は接種24時間後の蛍光抗体法による感染率(%)。

表21 オオムギプロトプラスト分離時におけるシクロヘキシミドとリジン処理のBMV RNA感染に及ぼす影響

接種条件	シクロヘキシミド ($\mu\text{g/ml}$)	リジン (mM)	感染率 ^{a)} (%)
1 $\mu\text{g/ml}$ BMV RNA, 1 $\mu\text{g/ml}$ ポリオルニチン, 10 mM グイン酸 緩衝液, pH 5.0, 0.5 M マンニトール	0	0	36
	0.1	0	65
	0	10	50
1 $\mu\text{g/ml}$ BMV RNA, 25 $\mu\text{g/ml}$ 7-デオキシ硫酸, 100 mM リン酸 緩衝液, pH 6.0, 0.4 M マンニトール	0	0	5
	0.1	0	15
	0	10	11

a) 接種44時間後, 蛍光抗体法により判定.

オムギプロトプラストのRNA感染は、そのような処理を受けてないものより高率に起ることがわかった（表21）。

緩衝液の種類とそのpHと濃度の影響

いくつかの他のプロトプラスト-ウイルス系ではクエン酸よりリン酸緩衝液で感染が効率良く起ることが知られて^{1,51,65)}いるが、RNA感染にはリン酸緩衝液よりクエン酸緩衝液が適していた（表21と22）。最適pHはクエン酸緩衝液では4.7, リン酸緩衝液では6.0であった（表21, 実験1, 2と3）。リン酸緩衝液で最適pHがクエン酸緩衝液より多少高くpH 6.0付近になることは、他のプロトプラスト-ウイルス系と同様であった。クエン酸緩衝液の最適濃度は20 mMで、50 mM以上にすると感染はほとんど起らなかった（表22, 実験4）。100 mMクエン酸緩衝液を用いる場合、接種時のマンニトール濃度を0.5 Mから0.4 Mに下げても、感染には何の効果も与えなかった。しかし、接種時のRNA

表22 オオムギプロトプラストのBMV RNA
A感染に及ぼす緩衝液イオン, pHと
濃度の影響

実験	緩衝液	緩衝液 濃度 (mM)	pH	BMV RNA 濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	感染率 ^{b)} (%)
1	クエン酸	10	4.7	2.7	17
		"	5.0	"	15
		"	5.2	"	12
		"	5.7	"	11
		"	6.2	"	9
2	クエン酸	10	4.7	0.9	52
		"	5.0	"	34
		"	5.2	"	34
		"	5.7	"	34
		"	6.2	"	36
3	リン酸	25	5.4	0.4	19
		"	6.0	"	24
		"	7.0	"	7
		"	8.0	"	9
	クエン酸	20	5.0	"	45
4	クエン酸	5	5.0	0.8	30 (1)
		10	"	"	36 (5)
		20	"	"	42 (8)
		50	"	"	8 (10)
		100	"	"	2
		100 ^{a)}	"	"	3
	リン酸	10	6.0	"	20
		25	"	"	16
		50	"	"	16
		100	"	"	17

a) マンニトール濃度は 0.4 M。

b) 接種44時間後, 蛍光抗体法により判定。()は $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ BMV RNAで接種。

A濃度を $4 \mu\text{g/ml}$ に高めると、 $0.8 \mu\text{g/ml}$ の接種に比べ感染効率は非常に落ちるが、クエン酸濃度を 50 mM まで高めても感染は漸次増加した（表22，実験4）。一方，リン酸緩衝液では，感染はその濃度によりほとんど影響を受けなかった（表22，実験4）。

Sarkar⁹²⁾ らは，高pH，高イオン強度の溶液を用いるとタバコプロトプラストのTMVRNAによる感染が高率に起ると報告しているが，同様の条件でBMVRNAをオオムギプロトプラストに接種しても，2～4%の感染率しか得られなかった。

ポリオルニチンとRNA濃度の影響 一般に，ポリカチオンは接種条件下で負に荷電しているウイルスでプロトプラストを感染させる場合不可欠である（第Ⅲ章，第1節）¹⁰⁵⁾。RNA感染もポリオルニチンにより促進され，その濃度を高めるにともなって感染率も増加した（表23）。しかし， $1 \mu\text{g/ml}$ 以上のポリオルニチンではしばしばプロトプラストが

凝集を起し、破損した。またRNA感染はRNA濃度により大きく影響された。 $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で接種すると感染率はむしろ減少し、通常 0.1 から $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ の範囲で最大の感染率が得られた(表22と23)。一方、 10 mM リン酸緩衝液では、RNA濃度を 0.3 から $9\text{ }\mu\text{g/ml}$ まで高めるにともなって感染率も増加した。しかし、その場合最大で 30% の感染率を越えることはなかった。なお、この場合、ポリオルニチン($1\text{ }\mu\text{g/ml}$)の代りにプロタミン硫酸($25\text{ }\mu\text{g/ml}$)を用いても同様であった。

二価カチオンの影響 カルシウムやマグネシウムのような二価カチオンが接種時に存在するとBMV粒子による感染は強く阻害されたが、RNA感染の場合、これらのイオン($0.1 \sim 1\text{ mM}$)はむしろ感染を促進した(表24)。

温度の影響 20°C あるいは 30°C よりも 0°C (水中)で接種したときにプロトプラ

表23 オオムギプロトプラストのBMVRNA
A感染に及ぼすポリオルニチンとRNA
A濃度の影響^{a)}

実験	BMVRNA 濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	ポリオルニチン 濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	感染率 ^{b)} (%)
1.	0.1	0	4
	"	0.1	4
	"	0.5	15
	"	1	49
	0.5	0	4
	"	0.1	3
	"	0.5	20
	"	1	48
2.	0.003	1	4
	0.03	"	17
	0.3	"	34
	3	"	22
	9	"	17

a) 20 mM クエン酸緩衝液, pH 5.0 (実験1), 10 mM クエン酸緩衝液, pH 5.0 (実験2).

b) 接種26時間後(実験1), 44時間後(実験2), 蛍光抗体法により判定.

表24 オオムギプロトプラストのBMV RNA
A感染に及ぼす二価カチオンの影響^{a)}

濃度 (mM)	MgCl ₂	CaCl ₂
0	43 ^{b)}	43
0.1	48	53
1	47	52
10	28	30

a) 1μg/ml BMV RNA, 1μg/ml ホリオルニチン, 10mM グエン酸緩衝液, pH 5.0.

b) 数値は接種44時間後の蛍光抗体法による感染率(%)。

表25 オオムギプロトプラストのBMV RNA
A感染に及ぼす接種温度と接種前処理
の影響^{a)}

実験	温度 (°C)	接種前処理 (分)	感染率 ^{b)} (%)
1.	0	0	35
	0	10	43
	30	0	17
	30	10	27
2.	0	10	69
	20	10	23

a) 1 μ g/ml BMV RNA, 1 μ g/ml ホリオルニチン, 10 mM クエン酸緩衝液, pH 5.0
(実験1), 実験2は表26を参照。

b) 接種43時間後(実験1), 24時間後(実験2), 蛍光抗体法により判定。

ストのRNA感染はより効率良く起った(表20と25)。

RNAのポリオルニチンによる前処理の影響 一般に、ポリカチオン依存性のウイルス感染では、ウイルスとポリカチオンの接種前処理がその感染にとって不可欠である。^{51,85,105)}

RNA感染ではそのような前処理は必ずしも必要でなかったが、RNAとポリオルニチンの10分の前処理は感染を促進した(表25)。

ここに述べたRNA接種法が他のプロトプラスト-ウイルスRNA系にも適用できるかどうかを調べるため、タバコプロトプラストへのTMV RNAとBMV RNAの接種を最適条件(表26)下で試みた。TMV RNA (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)とBMV RNA (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を単独で接種すると、62%と69%のプロトプラストがそれぞれ感染した。また両RNAをそれぞれ0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で混合接種すると、TMV特異蛍光抗体染色では68%、BMV特異蛍光抗体染色では47%のプ

表26 プロトプラストのウイルスRNAによる感染の最適条件

プロトプラストの分離	:	0.5 M マンニトール
接種溶液の組成	:	0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNA
	:	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ポリオールニチン
	:	20 mM クエン酸緩衝液 pH 4.7
	:	0.5 mM CaCl_2
	:	0.5 M マンニトール
接種前処理 ^{a)}	:	0°C, 10 分
接種処理	:	0°C, 15 分
接種後洗浄	:	1 ~ 10 mM CaCl_2 を含む 0.7 M マンニトール

^{a)} 溶液の組成は接種溶液の2倍 (マンニトールは 0.5 M)。

プロトプラストが、また両抗体の混合染色では65%のプロトプラストが染色された。ただし、これらの感染率はいずれも接種24時間後に検定したものである。このようにBMVとTMVのようにウイルス粒子による接種条件が非常に異なる場合でも、RNAを接種源とすることで同時にプロトプラストを感染させることが可能になった。

考 察

低濃度のウイルスRNA (0.1 ~ 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を用い植物プロトプラストを高率に感染させることが可能になった。その感染効率、ササゲモザイクウイルス (CPMV) RNA-ササゲプロトプラスト系で⁸⁾ BeierとBrueningが報告したものより、約100倍優るものである。RNA感染に影響する大きな要因の一つは、プロトプラスト分離・接種時のマンニトール濃度であった。このことは植物プロトプラストを高張液処理すると、RNaseの⁹⁾ de novo 合

成が起り、細胞中の RNase 活性が高まること⁴⁾と関係していると考えられる。また、プロトプラスト中の RNase 活性を抑制するようなリジンやシクロヘキシミド処理の RNA 感染に及ぼす効果からもこのことは明らかである。今日まで、効率の良いウイルス RNA-プロトプラストの感染系が確立されなかった大きな原因の一つは、プロトプラスト分離・接種時に比較的高濃度のマンニトール (0.7 ~ 0.8 M) が用いられてきたことによる。実際、Beier と Bruening⁸⁾ は CPMV-RNA-ササゲプロトプラスト系で、0.45 M マンニトールを用いて、かなり高濃度の RNA で接種した場合であるが、65% のプロトプラストが感染したことを報告している。

RNA 感染に影響するもう一つの大きな要因は、ウイルス粒子による感染の場合と同様、RNA 分子の静電的性質性であろう。ポリオルニチン濃度 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ で RNA 濃度を変えた場合、RNA 濃度が $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上になると感染が減

少しした。このことはRNA-ポリオルニチン複合体の正電荷がRNAの負電荷により中和されすぎたためであろう。感染系における一つの因子、たとえば緩衝液の種類、濃度とpHの変化は他の因子の最適レベルを変えるが、このことはウイルスRNA-ポリオルニチン複合体の性質の変化を反映しているのである。

第Ⅵ章 B M V の増殖過程

第1節 B M V の増殖に影響する因子

B M V の増殖過程を解析するにあたり、プロトプラスト系でウイルスが同調的に増殖しているかどうか、また、その増殖に影響する培養条件を検討する必要がある。液体培養が可能なプロトプラスト系では、培養時の環境条件のコントロールが非常に容易であり、抗生物質などの薬剤のウイルス増殖に対する影響を調べることも植物体レベルに比べ、比較的容易である。

方 法

B M V の感染・増殖の検定は蛍光抗体法と *C. hybridum* での生物検定により行った。約 1×10^6 個のプロトプラストを 150 g, 3 分の遠心分離で集め, 1 mM CaCl_2 を含む 0.7 M マンニトールでさらに 2 回洗浄後, 一部をスライドグラスにはりつけ, 残りは -20°C で凍結した。凍結プロトプラストに, 2 mM

MgCl₂を含む0.01 M 酢酸緩衝液, pH 5.0
を1 ml 加え, テフロンあるいはガラスホモ
ジナイザーで1~2分撹碎した。その撹碎液
を直接あるいは2,000 g, 5分で遠心分離
した上澄を適当な倍率で希釈して接種に用い
た。6~8葉期の *C. hybridum* 葉にカーボランダム
を散布し, 綿棒を用いて8~12枚の半葉
に接種し, 3~5日後に局部病斑数を計算し
た。

結 果

増殖曲線 B M V 粒子と B M V R N A を
接種源とした場合の増殖曲線をそれぞれ図13
と図14に示す。B M V 粒子による接種では,
接種直後のプロトプラストにも感染性が認め
られたが, 9時間後には感染性はまったく
検出できなかった。接種16時間から24時
間まで感染性は急激に増加し, その後65時
間まで徐々に増加しつづけた。B M V R N A
を接種源とした場合は, 接種直後の感染性は

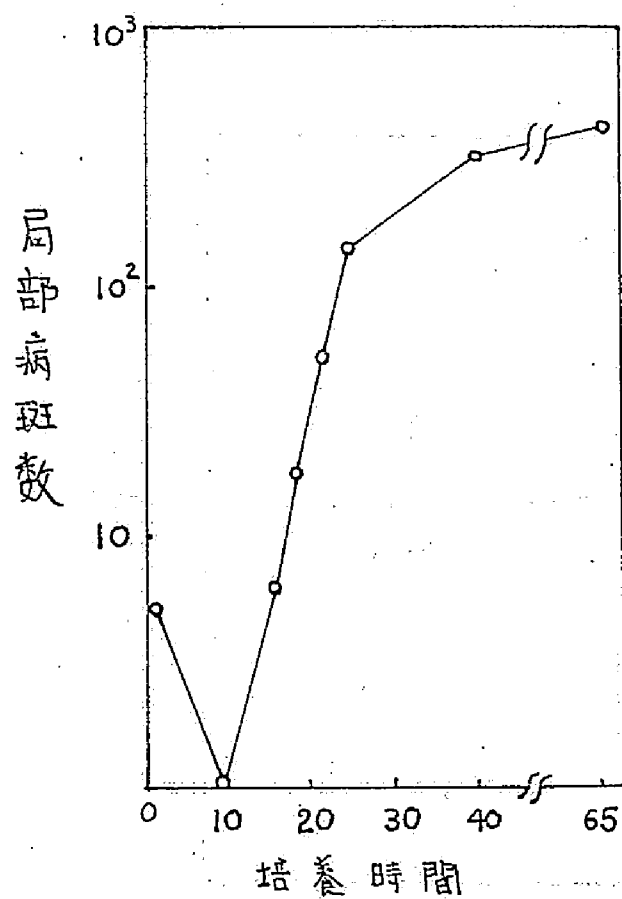


図13 BMV接種オオムギプロトプラストにおける
ウイルス増殖曲線

縦軸は8枚の *Chenopodium hybridum* 葉上の総病斑数

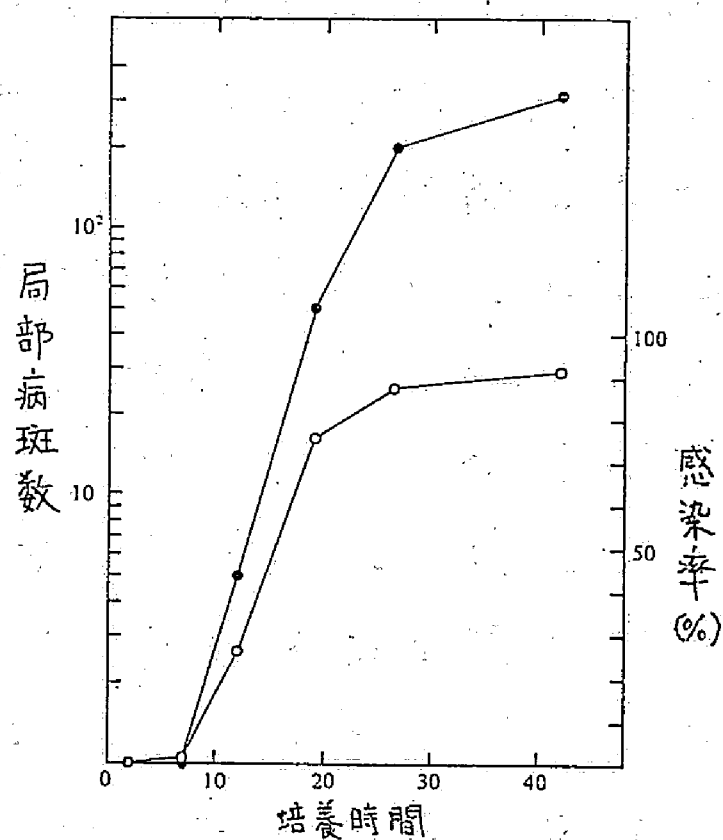


図 14 BMV RNA 接種 オオムギ プロトプラスト
におけるウイルス増殖曲線

局部病斑数は 8 枚の *Chenopodium hybridum* 葉の半葉上
に形成された病斑の平均。

感染率は蛍光抗体法により判定。

認められなかったが、その後の増殖はBMV粒子接種の場合と同様であった。BMV粒子とBMVRNAを接種源とした場合の増殖曲線をよりくわしく比較するため、同じプロトプラスト試料を用いて接種実験を行った結果を図15に示す。粒子の場合、接種2時間後に認められた感染性が7時間後に一度なくなり、その後感染性は急激に増加した。一方、RNAの場合、最初に感染性が検出されるのは接種7時間後であり、その後感染性は引き続き増加した。BMV粒子接種プロトプラストをBMV特異蛍光抗体で染色すると、接種2時間と7時間後のプロトプラスト膜の表面は薄い蛍光を発した。一方、RNA接種区ではそのような蛍光は見られなかった。また、この蛍光はBMV感染プロトプラストの発するものとはその局存性と強度の差により容易に識別できた。

抗生物質の影響 クロラムフェニコール
とアクチノマイシンDはBMVの増殖にまっ

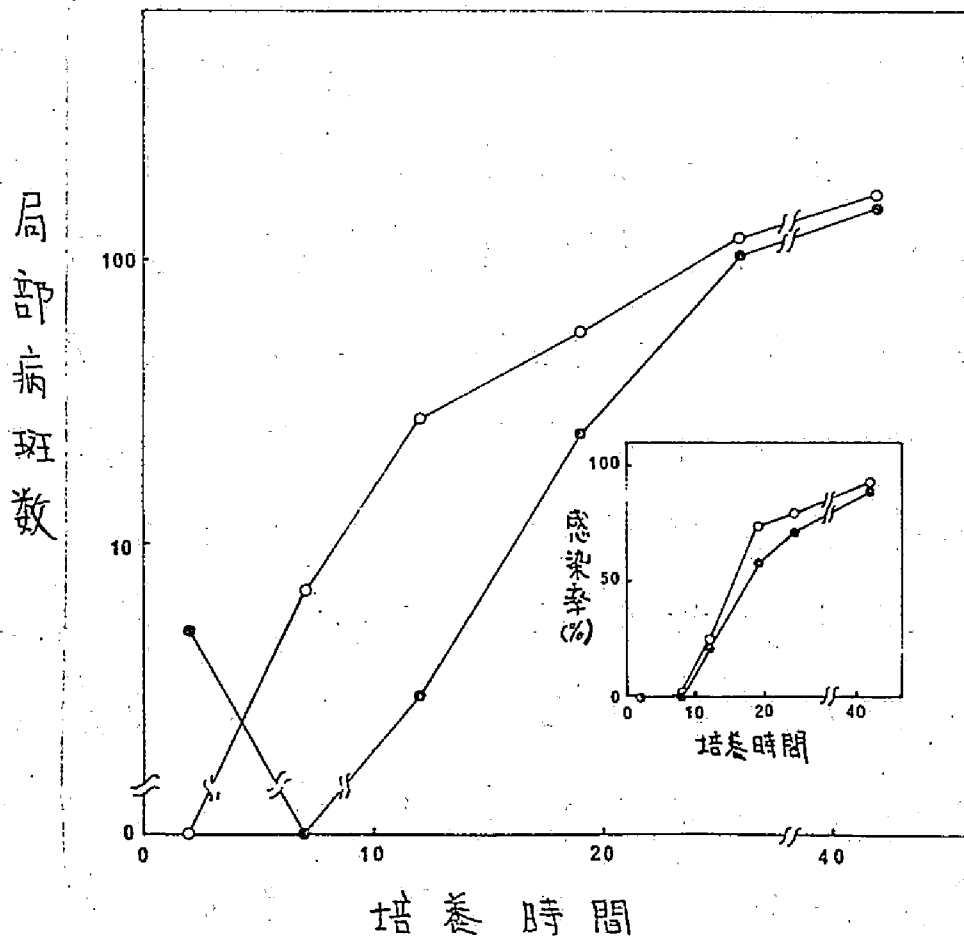


図 15 BMV 粒子 (○—○) と BMV RNA (●—●) 接種材料を用いたプロトプラストにおけるウイルス増殖曲線

局部病斑検定法は図 14 参照。

感染率は蛍光抗体法により判定。

たく影響を与えなかったが、シクロヘキシミドは非常に低濃度 ($0.01 \mu\text{g/ml}$) でBMVの増殖を完全に阻害した (表27)。

温度と光の影響 BMV接種プロトプラストを 17°C で培養すると 25°C に比べウイルス増殖量は約 $1/10$ に減少し、 $0 \sim 7^{\circ}\text{C}$ の培養ではまったく増殖が認められなかった。また、オオムギプロトプラストでのBMVの増殖は、プロトプラスト培養時の光条件により大きく影響を受けた。暗黒培養した場合のBMVの増殖量は、 800 ルックスで培養した場合の $1/3 \sim 1/10$ に減少した。BMV増殖量と培養時の光照射時間は、その時期をとわず、ほぼ比例関係にあった (表28)。しかし、強照度 ($3,500$ ルックス) で培養するとプロトプラストの漂白化が激しく、BMV増殖量も 800 ルックスで培養したときより減少した。

表27 抗生物質のBMV増殖に及ぼす影響

抗生物質	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	阻害率 (%)
—	0	0
アクリノマイシンD	20	1
クロラムフェニコール	100	28
	300	0
	1000	15
シクロヘキシミド	0.001	50
	0.01	100
	0.1	100
	1	100
	10	100

考 察

B M V 粒子接種区での暗黒期以前の感染性は、膜に吸着したウイルス粒子によるものと考えられるが、プロトプラスト内に取り込まれたウイルス粒子も感染性に関与しているものと思われる。しかし、接種 7 ~ 9 時間後には、そのような粒子もプロトプラストの破碎により不活化される状態にあったものと考えられる。RNA 接種区で、粒子の場合に比べ増殖曲線の立ち上りが早いのは、ウイルス粒子の脱外被蛋白質を含む感染の初期過程が省かれるためと考えられる。B M V が同調的に増殖していることは、暗黒期以後指数関数的に急激な増殖が起ることからも確かめられた。また、第 III 章第 1 節の結果からも明らかなように、1.0 mM CaCl_2 を含む pH 6.5 の培養液中で B M V の 2 次感染が起ることは不可能である。

70 S リボソーム系の蛋白質合成阻害剤であるクロラムフェニコールでは B M V の増殖

は阻害されず、80Sリボソーム系蛋白質合成阻害剤のシクロヘキシミドで完全に阻害されたことより、BMV増殖に関与する植物細胞側の蛋白質あるいはウイルス自身のコードしているウイルス特異蛋白質の合成は細胞質80Sリボソーム系で起っていることが明らかになった。また、培養時の光のBMV増殖に及ぼす影響は、ウイルス増殖に要求されるプロトプラストの代謝活性が光合成により供給されるエネルギーに依存していることを示している。

第2節 BMV感染特異的RNAポリメラーゼ活性

植物ウイルスのRNAレプリカーゼあるいは感染特異的RNAポリメラーゼに関しては、TMVをはじめ多くのウイルスで研究されてきたが、^{26, 40)} バクテリオファージ、特に Q_{β} のレプリカーゼの研究で^{44, 50)}得られた知見には、はるかに及ばない。BMVのRNAポリメラーゼに

に関しては、今まで^{52,53,95,96)} Kummert と Semal らにより膜結合蛋白質として、また^{44,45)} Frankel-Conrat 一派により可溶化蛋白質として研究されてきた。ここでは *in situ* における酵素活性をできる限り再現するため、⁵²⁾ Kummert and Semal (1972) の方法を再検討して膜結合蛋白質として調製し、感染後の RNA ポリメラーゼ活性の経時的変化および B M V ゲノムを構成する各 RNA の接種による RNA ポリメラーゼ活性誘導能について検討した。

方 法

膜結合 RNA ポリメラーゼ画分の調製

プロトプラストを遠心分離で集め、さらに 0.1 mM CaCl_2 を含む 0.7 M マンニトールで 2 回洗浄した。沈殿プロトプラストを 1.5 ml の攪碎溶液 (0.01 M KCl , 0.01 M 2-メルカプトエタノールと 0.002 M-EDTA を含む 0.05 M トリス塩酸緩衝液, pH 7.6) に懸濁し、テフロンホモジナイザーで攪碎し

た。その搾碎液を1,000g, 10分の遠心分離にかけ上澄を得た。その上澄の20,000g, 15分の遠心分離で得られる沈殿を膜結合RNAポリメラーゼ画分とした。以上の操作はすべて0~4℃で行った。

RNAポリメラーゼ活性の測定

RNAポリメラーゼ画分の沈殿に一定量の培養溶液 (0.01 M-KCl, 0.016 M-MgCl₂, 0.01 M 2-メルカプトエタノールと 0.001 M-EDTA を含む 0.05 M トリス塩酸緩衝液, pH 8.6) を加え, マイクロピペットを用い均一の懸濁液とした。標準反応液は以下の構成成分を含む: 90 μl の酵素溶液, 10 μl の³H-UTP (特異放射能活性, 53 Ci/mmol), 10 μl のRNA合成必要成分 (最終濃度は 500 μg/ml ATP, GTP, CTP; 20 μCi/ml ³H-UTP, 15 μg/ml アクチノマイシンD)。ホスホエノールピルベートとピルベートカイネースはRNAポリメラーゼ活性に対して効果を持たなかった。ので反応液に加え

なかった。酵素反応は 28°C 、暗黒下で行った。酵素活性の測定は以下のように行った。反応液の一定量 ($60 \sim 100 \text{ ml}$) をワットマン 3MM 紙 (2.4 cm) に吸収させ、 $0 \sim 4^{\circ}\text{C}$ の 0.01 M ピロリン酸ナトリウムを含む 5% トリクロル酢酸 (TCA) 溶液 (3紙/30 ml) に浸せきし、15分毎に溶液を変え、4~5回洗浄した。95% エタノールで同様にして5分、3回洗浄後、3紙をバイアルに移し、ヘアドライヤーで乾燥させた。放射能活性は、バイアルに $8 \sim 10 \text{ ml}$ の液体シンチレーション溶液 (5g PPO, 0.3g ジメチル POPP / 1ml トルエン) を加え、液体シンチレーション測定機 (Horiba) で測定した。

BMV RNA 成分の分画 エタノール沈殿 RNA を 0.2% SDS, 1M 尿素と 2.5% シュ糖を含む電気泳動用緩衝液⁵⁹⁾ (0.002 M EDTA と 0.02 M 酢酸ナトリウムを含む 0.04 M トリス酢酸緩衝液, $\text{pH } 7.8$) で溶解し、 60°C で7分加熱した。0.5% アガロ

ースを含む2.1%アクリルアミドゲルを
 Loening (1967)⁵⁹⁾の方法に従って作成し、内
 径0.7 cmのアクリルチューブに深さ9 cm
 になるよう流し込み、重合させた。RNAを
 チューブ当り20~40 μ g (20~40 μ l)
 装てんし、5 mA/チューブの電流で2.5~3時
 間、室温で電気泳動した。泳動後、ゲルを
 0.05%トリジンブルー⁶⁰⁾を含む0.05 M
 酢酸緩衝液で10~15秒染色し、脱イオン
 交換水で脱色した。染色されたバンドRNA
 1 + RNA 2, RNA 3とRNA 4を安全カ
 ミソリで切り取り、注射器を用いてゲルをつ
 ぶした。つぶれたゲルにRNA抽出用溶液を
 それぞれ1 ml 加え、15分間、室温で激し
 く振とうし、一夜室温で放置した。その後の
 RNA抽出はフェノール法により行った(第
 V章)。エタノール沈殿RNAを0.001 M
 $MgCl_2$, 0.001 M $CaCl_2$ と1 μ g/mlポリビニ
 ル硫酸を含む0.1 M酢酸緩衝液, pH 5.5¹⁰⁾で
 溶解した。同緩衝液で5~20%の直線的濃

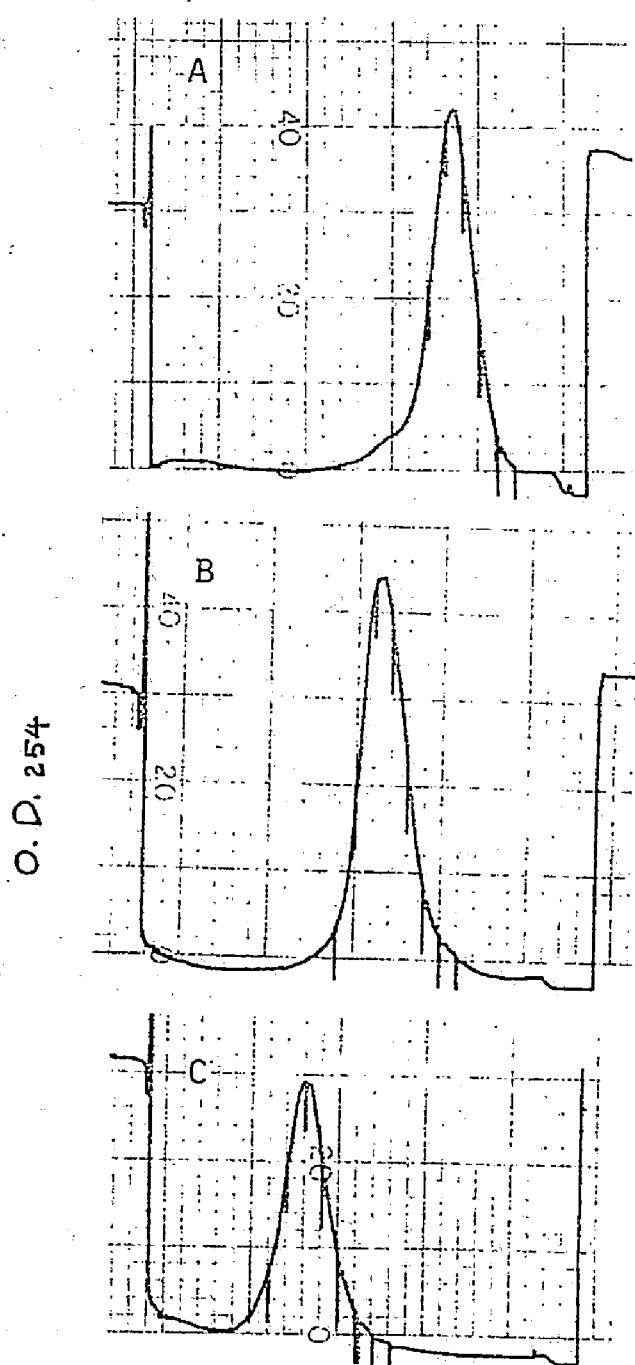


図 16

ポリアクリルアミドゲル電気泳動分離 BMV RNA
のショ糖濃度勾配遠心分離パターン

A. RNA 1+2, B. RNA 3, C. RNA 4

5~20% ショ糖濃度勾配, 39,000 rpm, 4.5 時間

度勾配を持つショ糖溶液を日立濃度勾配作成機を用いてRPS-40用セルロースチューブ(ベックマン)に作成し、RNA溶液(0.5 ml)をその上に静かに重層した。遠心分離は日立RPS-40ローターを用い39,000 rpm, 4.5~5時間あるいは22,000 rpm, 14~16時間, 16°Cで行った。遠心分離後、ISCO密度勾配分画器(モデル640)を用い0.2 mlづつ分画し、ISCO吸光度モニター(モデルUA5)で254 nmの吸光度を測定した(図16)。

結 果

アクチノマイシンDに抵抗性の膜結合RNAポリメラーゼ活性は、BMV感染区では非接種区の約10~30倍に増大した。その活性は4種の基質ATP, GTP, CTP, UTPの存在に依存し(表29), 外生的に加えられたBMVRNAにはほとんど依存しなかった(図17)。非感染プロトプラストの酵素

表29 膜結合RNAポリメラーゼ活性に及ぼすATP, CTP, GTPとアクチンマイシンD (AMD)の影響^{a)}

組成	酸不溶性画分への ³ H-UTPの 取り込み (CPM) ^{b)}	
	非接種	BMT感染
—	145	318
ATP	329	1398
ATP + GTP	342	1554
ATP + GTP + CTP	779	3463
ATP + GTP + CTP + AMD	178	2759

a) 膜結合RNAポリメラーゼ画分は培養26時間後のオオムギプロトプラストから調製。

b) 酵素反応; 60分, 28°C。

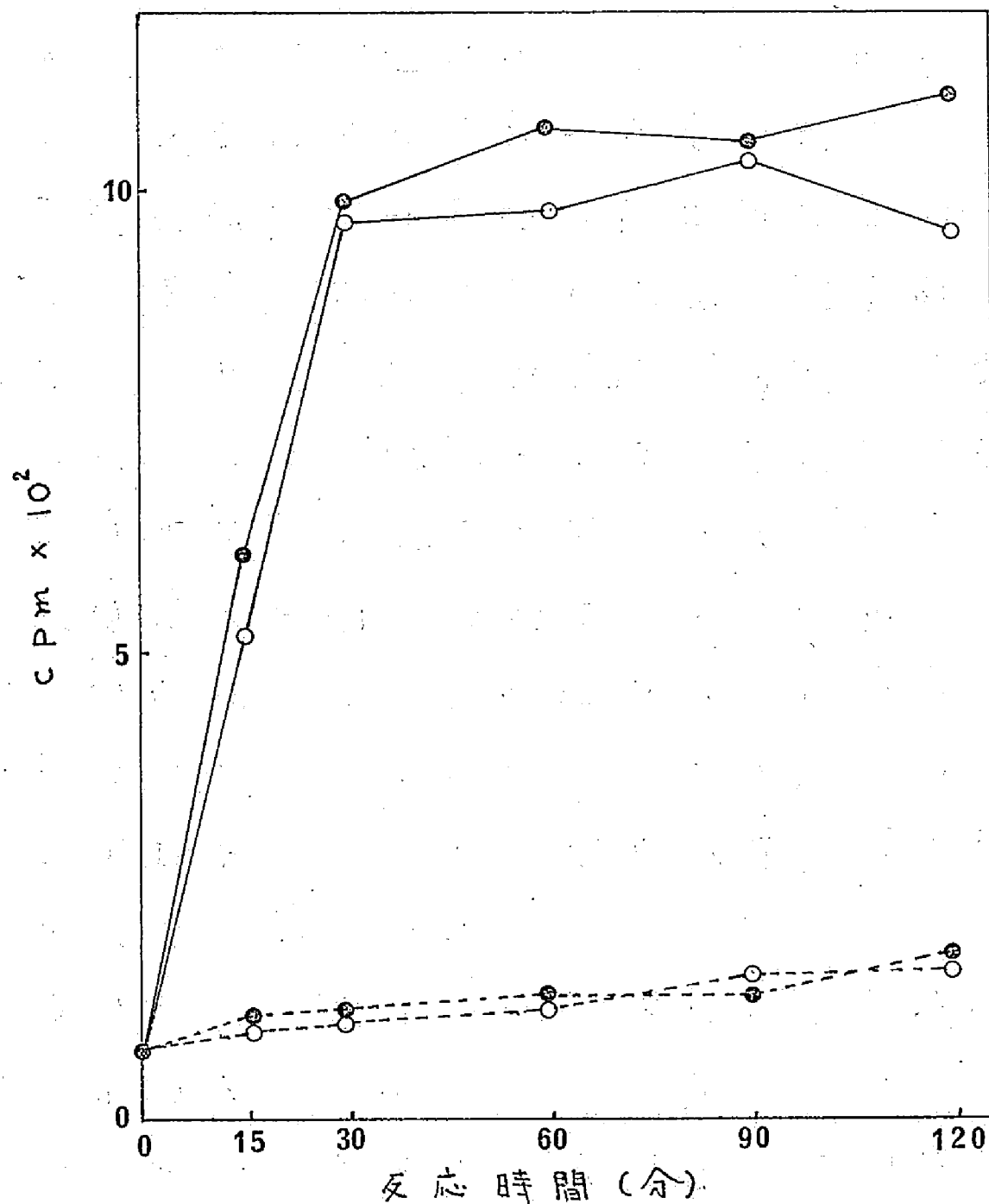


図 17

BMV感染(実線)と非感染(破線)オムキプロトプラスト膜結合RNAポリメラーゼ活性に及ぼす外生BMV RNAの影響

膜結合RNAポリメラーゼ活性は接種26時間後のプロトプラストより調製

BMV RNA: 10 μ g/ml (●), 0 μ g/ml (○)

素画分においても、対照区に比べわずかに酸不溶画分への ^3H -UTPの取り込みが見られたが、その取り込みの80%以上はアクチノマイシンDにより阻害された(表29)。

酵素反応系での反応時間に対する ^3H -UTPの酸不溶画分への取り込み曲線を図18に示す。取り込み活性は反応開始後約60分で飽和に達した。感染区では、接種の時間で感染特異的な取り込みがすでに認められ、その活性は感染時間の経過に伴って増加した。一方、非接種区での取り込み活性は培養7, 19, 26時間で差がなかった。また、BMV-タニコプロトプラスト系でもほぼ同様の結果が得られた(図19)。

BMV感染後の時間経過による感染特異RNAポリメラーゼ活性の変動をよりくわしく調べるため、ウイルス接種後4時間毎にオオムギプロトプラストより膜結合酵素画分を調製し、その活性を測定した。ポリメラーゼ活性は感染8時間で最初に認められ、感染30

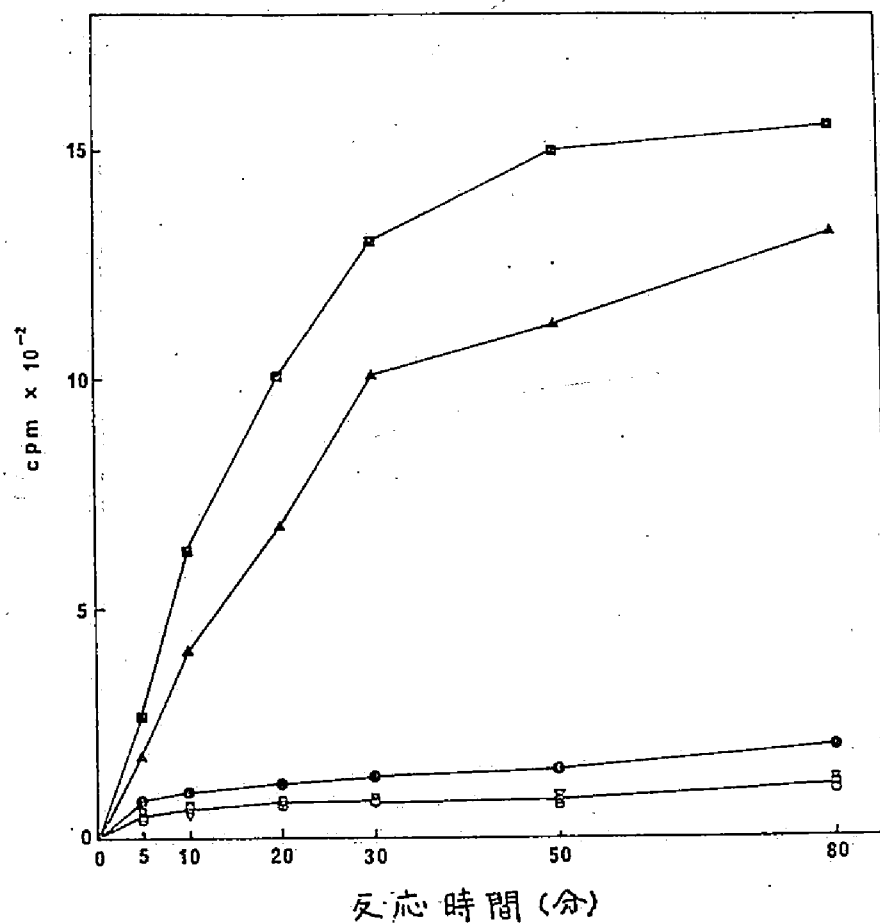


図 18 BMV 感染 (■, ▲, ●) と 非感染 (□, △, ○) オオキ
プロトプラスト膜結合 RNA ポリメラーゼ画分における
3H-UTP の 酸不溶画分への取り込み

●, ○: 接種 7 時間後
▲, △: 接種 19 時間後
■, □: 接種 26 時間後

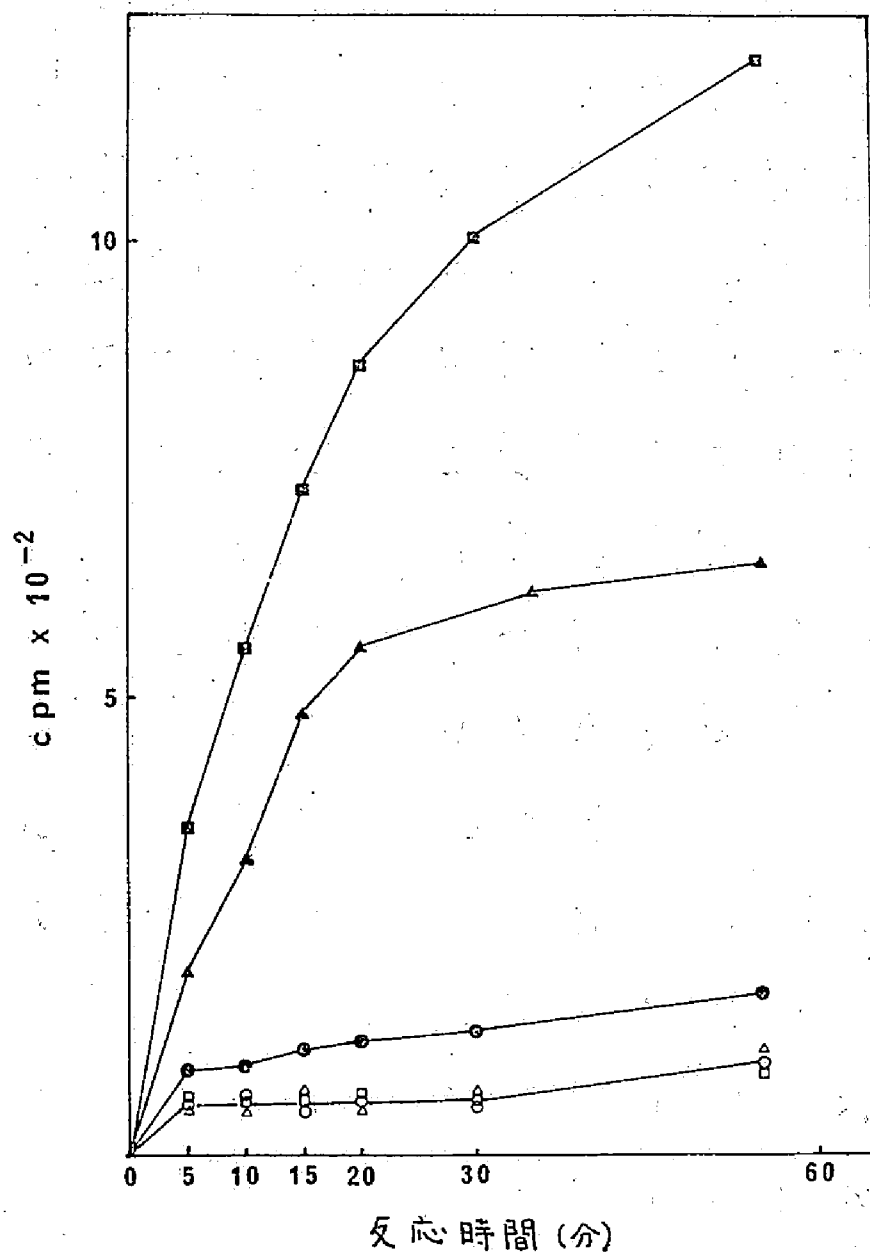


図 19 BMV 感染と非感染タバコプロトプラスト膜結合 RNA ホリメラーゼ画分における ^3H -UTP の酸不溶画分への取り込み

●, ○: 接種 19 時間後

▲, △: 接種 26 時間後

■, □: 接種 43 時間後

●, ▲, ■: 感染

○, △, □: 非感染

時間まで急激に増加し、その後は徐々に減少した(図20)。一方、プロトプラスト中のウイルス感染性および蛍光抗体染色細胞数は、感染30時間後も増加しつづけた。

BMVを構成する4種のRNAをそれぞれ単独あるいは組合せを変えてプロトプラストに接種したとき、BMV感染特異的RNAポリメラーゼ活性が誘導されるかどうかについて調べた。BMV RNAをショ糖濃度勾配遠心分離にかけると、軽い方よりS、M、L画分として3つのピークに分かれ(図21)、L画分に感染性が存在することは知られている¹⁰⁾。ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)による分析で、S画分はRNA 4を、M画分はRNA 3を、L画分はRNA 1 + RNA 2に加えかなりのRNA 3を含んでいることがわかった。それらの分画されたRNAを最終濃度0.2 µg/mlでプロトプラストに接種したときの結果を表30に示す。M・RNAにはまだ感染性が少し認められたが、S・

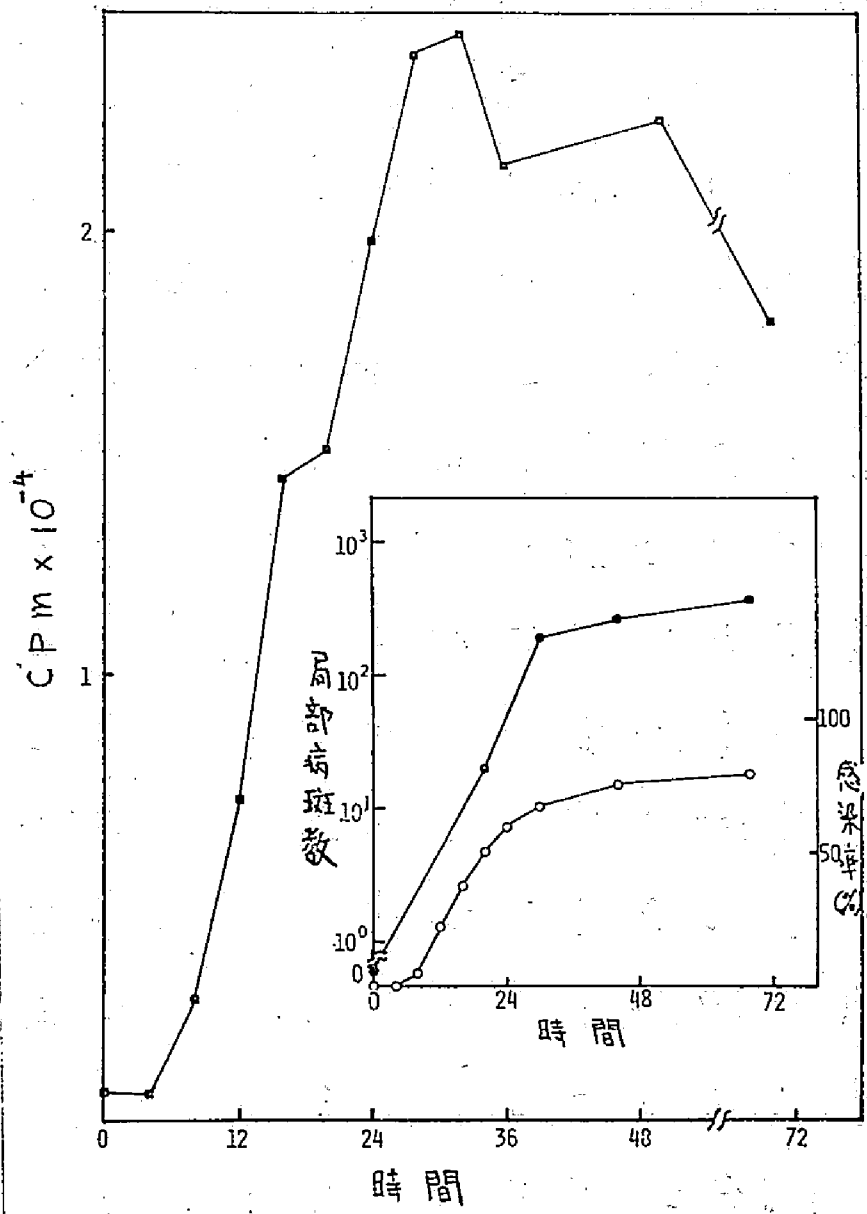


図 20 BMV感染オオムギプロトプラスト膜結合RNA
 ホリメラーゼ画分における ^3H -UTPの酸不溶画分
 への取り込み活性の感染時間経過による変動

RNAは感染性をまったく持たず、いずれの場合もRNAポリメラーゼ活性を誘導できなかった。L・RNAは高い感染性を持ち、RNAポリメラーゼ活性を誘導した。その感染性と酵素活性誘導能はM・RNAを加えてもまったく変わらなかった。ショ糖濃度勾配遠心分離を行う前にRNA溶液を熱処理すると、RNAの分離が著しく促進されることは知られている。⁴³⁾ 実際、BMV RNAを遠心分離の前に60℃、10分で熱処理すると、L画分へのRNA 3の混入はかなり減少したが、L RNAは依然高い感染性を持っていた。そこで、各RNA成分をさらに純粋な成分として得るため、まずPAGEでRNAを分画し、それらをショ糖濃度勾配遠心分離にかけアクリルアミドのモノマーを除いた。RNA 1 + RNA 2にはまだ感染性が認められたが、RNA 3を加えることによりその感染性は2~5倍に増大した(表31)。RNA 3とRNA 4には感染性はまったく認められず、RN

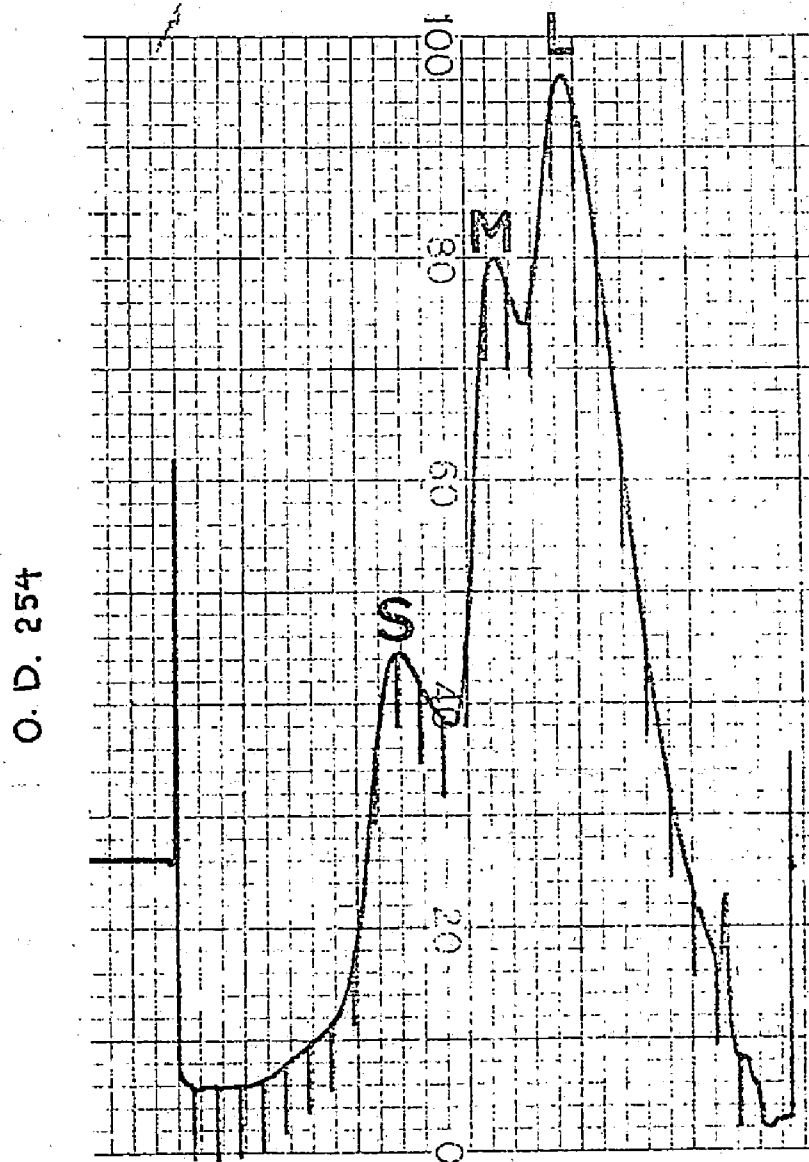


図 21 BMV RNA のショ糖濃度勾配遠心分離パターン

5~20% ショ糖, 39,000 rpm, 5 時間

表30 S, M, L画分BMT RNA接種によるオオムギプロトプラスト膜結合RNAポリメラーゼ活性の誘導^{a)}

RNA画分 ^{b)}	感染率 (%)	酸不溶画分への ³ H UTPの取り込み ^{c)} (cpm)
L	43	3281
L+M	41	2841
M	0.6	649
S	0	628
—	0	635

a) 膜結合RNAポリメラーゼ画分は接種26時間後に調製。

接種時の最終RNA濃度: $0.2 \mu\text{g/ml}$ 。

b) 5~20% ショ糖濃度勾配遠心分離により分画。

c) 酵素反応; 28°C , 60分。

Aポリメラーゼ活性も誘導されなかった(表31, 実験2)。RNA1 + RNA2の接種で誘導されるRNAポリメラーゼ活性は, RNA3を加えることにより感染性と同様増加した。しかし, RNA4にはその促進効果は見られなかった(表31, 実験2)。

考 察

非感染プロトプラストの膜結合RNAポリメラーゼ画分においても対照区の約6倍の取り込みが見られたが, アクチノマイシンDによりその活性の大半が阻害されたので, その活性はDNA依存RNAポリメラーゼの混入によるものと思われる。一方, 感染プロトプラストのRNAポリメラーゼ活性はアクチノマイシンDによりほとんど影響を受けず, 非感染プロトプラストの10~30倍に達したので, ウイルス感染特異的なものであることがわかる。植物体組織レベルでは, BMV感染特異的RNAポリメラーゼ活性が接種3~

表31 ポリアクリルアミドゲル電気泳動分離
BMV RNA接種によるオオムギプロ
トプラストの感染と膜結合RNAポリ
メラーゼ活性の誘導^{a)}

実験	BMV RNA			感染率 ^{b)} (%)	酸不溶画分への 3H-UTPの取り込み (cpm)
	1+2	3 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	4		
1.	0.05 ^{c)}	0	0	5	-
	0.1	0	0	16	-
	0.2	0	0	17	-
	0	0.1	0	0	-
	0	0	0.1	0	-
	0.05	0.05	0	26	-
	0.1	0.1	0	54	-
	0	0.05	0.05	0	-
	0	0.1	0.1	0	-
	0.67	0.67	0.67	37	-
	0.1	0	0.1	17	-
2.	0	0	0	0	186
	0	0	0.1	0	156
	0	0.1	0	0	188
	0.1	0	0	5	400
	0	0.1	0.1	0	182
	0.1	0	0.1	7	366
	0.1	0.1	0	20	1005
	0.05	0.05	0	13	727

a) 接種27時間後のプロトプラスト(1×10^6 個)より膜結合RNAポリメラーゼ画分を調製。

b) 接種27時間後、蛍光抗体法により判定。

6日後に最大になり、その後減少することが知られている。^{32,39,95)} BMV感染オオムギプロトプラストでは、膜結合RNAポリメラーゼ活性は感染後約30時間で最大に達し、その後減少した(図20)。この活性の低下は酵素蛋白質の合成速度の低下によるものと考ええると本章第3節での結果と一致する。また同時に、酵素蛋白質の分解の促進、あるいは酵素活性の抑制化のようなウイルス増殖過程に特異的な制御機構によることも考えられる。

一般にウイルスRNAは^{19,99,100)} *in vitro* コムギ胚蛋白質合成系をはじめ、動物の卵母細胞あるいは網状細胞蛋白質合成系で高いmRNA活性を持って²⁶⁾ いる。したがって、ゲノムを構成する組合せ以外のウイルスRNAをプロトプラストに接種して、いわゆる感染が起らない場合でも、そのRNAがmRNAとして働き、ウイルス特異蛋白質が合成されることは十分考えられる。BMVの場合、少なくともRNA 3とRNA 4が情報として持つ蛋白質だけで

はRNAポリメラーゼ活性を誘導できなかった。RNA 1 + RNA 2 に関しては、まだRNA 3 の混入によると思われる感染性があった。しかし、RNA 3 を補足すると感染性とRNAポリメラーゼ活性誘導能が増加したことより、RNA 1 とRNA 2 が情報として持つ蛋白質もRNA 3 の持つ蛋白質がないと完全なBMV RNAポリメラーゼを構成できないものと考えられる。

第3節 BMV感染特異的蛋白質合成

BMVの4種のRNAは *in vitro* ユムギ胚蛋白質合成系で、それぞれモノシストロニックmRNAとして働き、分子量の大きなRNAから順に120K, 110K, 35Kと20Kダルトンの蛋白質が翻訳されることが知られている。^{99,100)} しかし、今日までの植物体組織レベルの研究でBMV感染特異的に検出されたのは、外被蛋白質以外には34.5Kダルトンの蛋白質だけである。^{34,35)} このように、植物体レ

ベルの実験ではウイルスの同調的増殖が起らないため、ウイルス増殖過程におけるウイルス特異蛋白質の研究は非常に困難である。

ここではBMV感染と非感染プロトプラストを接種後経時的に放射性アミノ酸でパルスラベリングを行い、SDS-PAGEとフルオログラフィーによりBMV感染特異的蛋白質合成を解析し、それらのウイルス増殖過程での役割について考察する。

方 法

パルスラベリング法 BMV接種と非接種プロトプラストを約 1×10^6 個/ml の濃度になるよう培養液に懸濁し、各 1.5 ml を 50 ml 三角フラスコで培養した。接種後さまざまな時間に ^3H -ロイシン (1 mCi/ml ; 特異放射能活性, 43 Ci/mmol) を 15 μl 加え、2時間のパルスラベリングを行った。ラベリング後、8.5 ml の 0.7 M マンニトールを加え、2 ml と 8 ml に分けた。それぞれのプロトプラス

トを 0.1 mM CaCl_2 を含む 0.7 M マンニトールで 2~3 回洗浄した。2 ml 部分のプロトプラスト沈殿には、1% SDS, 1% スーメルカプトエタノール, 10% グリセリンと 0.005% ブロムフェノールブルーを含む 0.05 M トリス塩酸緩衝液, pH 6.8 (破壊用緩衝液⁵⁴⁾) を 100 ml 加え、沸騰水中で 90 秒加熱し、直ちに -20°C で凍結した。8 ml 部分のプロトプラストは 1,000 g 沈殿と 20,000 g 沈殿 (膜結合 RNA ポリメラーゼ画分) を得るため、先に述べた方法 (本章, 第 2 節) に従って分画し、それぞれの画分に 50~100 ml の破壊用緩衝液を加え、同上的方法に従って熱処理後、凍結した。また、20,000 g の上澄は放射能活性測定まで -20°C で凍結した。

SDS-ポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動 スラブゲルは 30% アクリルアミド (w/v) と 0.8% NN'-ビスメチレンアクリルアミドを含む保存溶液を用いて作成した。⁵⁴⁾

分析用ゲル (厚さ 0.2 cm , 縦 10 cm , 横 15 cm) は最終濃度が 10% アクリルアミド, 0.1% SDS, 0.375 M トリス塩酸緩衝液, pH 8.8 で, テトラメチレンエチレンジアミン (TMED) と過硫酸アンモニウムをそれぞれ最終濃度が 0.055% と 0.39% になるように加え重合させた。重層ゲルの最終濃度は, 4.5% アクリルアミド, 0.1% SDS, 0.125 M トリス塩酸緩衝液, pH 6.8 で, TMED と過硫酸アンモニウムをそれぞれ 0.1% と 0.3% になるように加え重合させた。電気泳動用緩衝液⁵⁴⁾は, 0.1% SDS, 0.025 M トリス, 0.192 M グリシンを含む pH 8.3 の溶液を用いた。凍結蛋白質試料を 60°C , 1 分の加熱で溶かし, 重層ゲル上に作られた溝に $20 \sim 60\text{ }\mu\text{l}$ 装てんした。電気泳動は $30 \sim 40\text{ V}$ で $16 \sim 20$ 時間, 室温で行った。泳動後, 蛋白質を 50% TCA で一夜, $5 \sim 7^\circ\text{C}$ で固定し, 0.1% コマジブリリアントブルーを含む 50% TCA で 35°C , 1 時

間染色した。脱色は7%酢酸-25%メタノール溶液で5~7°C, 2~3日処理して行った。

分子量測定のため、 γ -グロブリン(人), 牛アルブミン, 卵白アルブミンとマイオグロビンそれぞれ分子量160K, 67K, 45Kと17.8Kダルトンの標準蛋白質として同時に泳動した。

フルオログラフィー

BonnerとLaskey(197

4)¹²⁾の方法に従ってフルオログラフィーのための一連の処理を行った。脱色されたゲルを500mlのジメチルスルフォキサイドに30分浸せきした。さらに30分新たな同液に浸せきした後, 120ml(ゲル容積の約4倍)の20%2,5-ジフェニルオキサゾール(PPO)(w/w)を含むジメチルスルフォキサイドに3時間浸せきしPPOをゲルに浸み込ませた。つぎに500ml以上の水に1時間以上ゲルを浸せきし, 再びジメチルスルフォキサイドを水で置換した。減圧浸透下, 65

-70°C , 60~90分の乾燥処理でゲルを
 ワットマン3MMろ紙に張りつけた。乾燥し
 たゲルをLaskeyとMills⁵⁷⁾(1975)の方法に従っ
 て露光処理したKodak Royal X-O-Mat X ray filmと密着
 させ、ドライアイス存在下(-70°C)で7
 ~14日間露光した。

蛋白質画分へ取り込まれた放射能活性の測
 定 1,000gと20,000g泥殿の蛋白
 質試料の10~20ml および20,000g
 上澄の100mlをワットマン3MMろ紙に
 吸わせ、本章第2節の方法に従って行った。

結 果

BMV感染と非感染オオムギプロトプラス
 トにおける蛋白質合成

BMV接種とポリオルニチン($0.1\text{ }\mu\text{g/ml}$)
 処理したオオムギプロトプラストを接種後1~
 3, 7~9, 18~20, 24~26, 30
 ~32と46~48の2時間, ^3H -ロイシンで
 パルスラベリングを行い、全プロトプラスト

1,000g 沈殿と20,000g 沈殿の3画分の蛋白質を分析した。接種後1〜3時間パルスラベリングでは,³H-ロイシンのプロトプラストへの取り込み,あるいは蛋白質合性活性が弱いため,合成蛋白質量は他の時期の $1/4 \sim 1/7$ であった(表33)。

20,000g 沈殿膜結合RNAポリメラーゼ画分のフルオログラフを図22に示す。B₁V感染特異的に4種の蛋白質が認められ,それらの分子量はそれぞれ120K (P1), 110K (P2), 36K (P3)と19.5K (P4) ダルトンであった(図23)。P1とP2のバンドはフィルム原版では7〜9時間パルスラベリングですでに認められた。P3とP4は18〜20時間パルスラベリングで最初に,しかし,顕著なバンドとして認められた。P4に対するP1とP2の合成は,46〜48時間ではそれより早い時期に比べておしる弱くなった。実際, P1のバンドはすべてのバンドが非常に薄い(実験操作中にプロ

表32 オオムギプロトプラスト酸不溶画分^{a)}
の³H-ロイシンの取り込み

パルスラベル (時間)	BMV感染	cpm
1 - 3	-	688
	+	653
7 - 9	-	4567
	+	2363
18 - 20	-	3528
	+	4210
24 - 26	-	2458
	+	2214
30 - 32	-	1680
	+	2009
46 - 48	-	3856
	+	2891

a) 破壊緩衝液処理プロトプラストの10ml部分で測定。

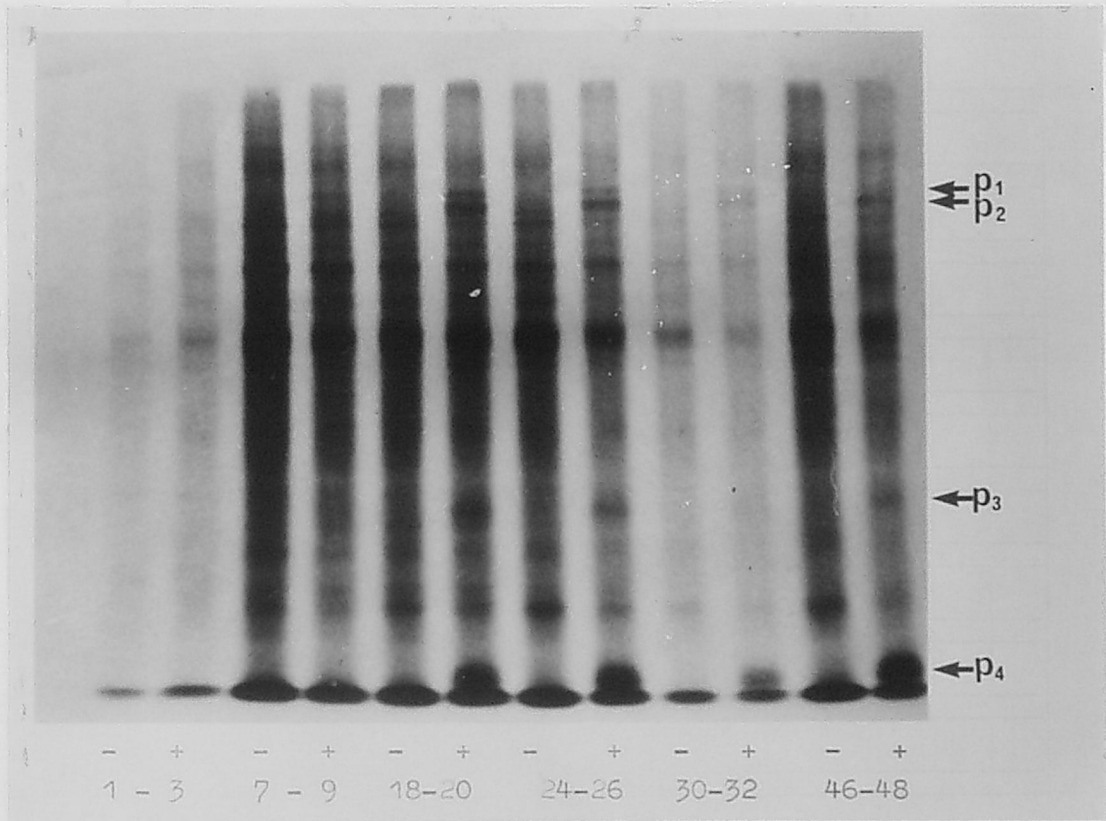


図22 BMV感染(+)と非感染(-)オオムギプロトプラストの膜結合RNAポリメラーゼ画分(20,000g沈殿)蛋白質のフルオログラフ

図23 ³H-ロイシンによるパルスラベリングは表記された2時間行った。
矢印: 感染特異蛋白質

標準蛋白質 (a) 3-アミノ酸 (160K), (b) 4-アミノ酸 (160K)
(c) 5-アミノ酸 (145K), (d) 6-アミノ酸 (118K)
矢印: BMV感染特異蛋白質 (図22に示す)

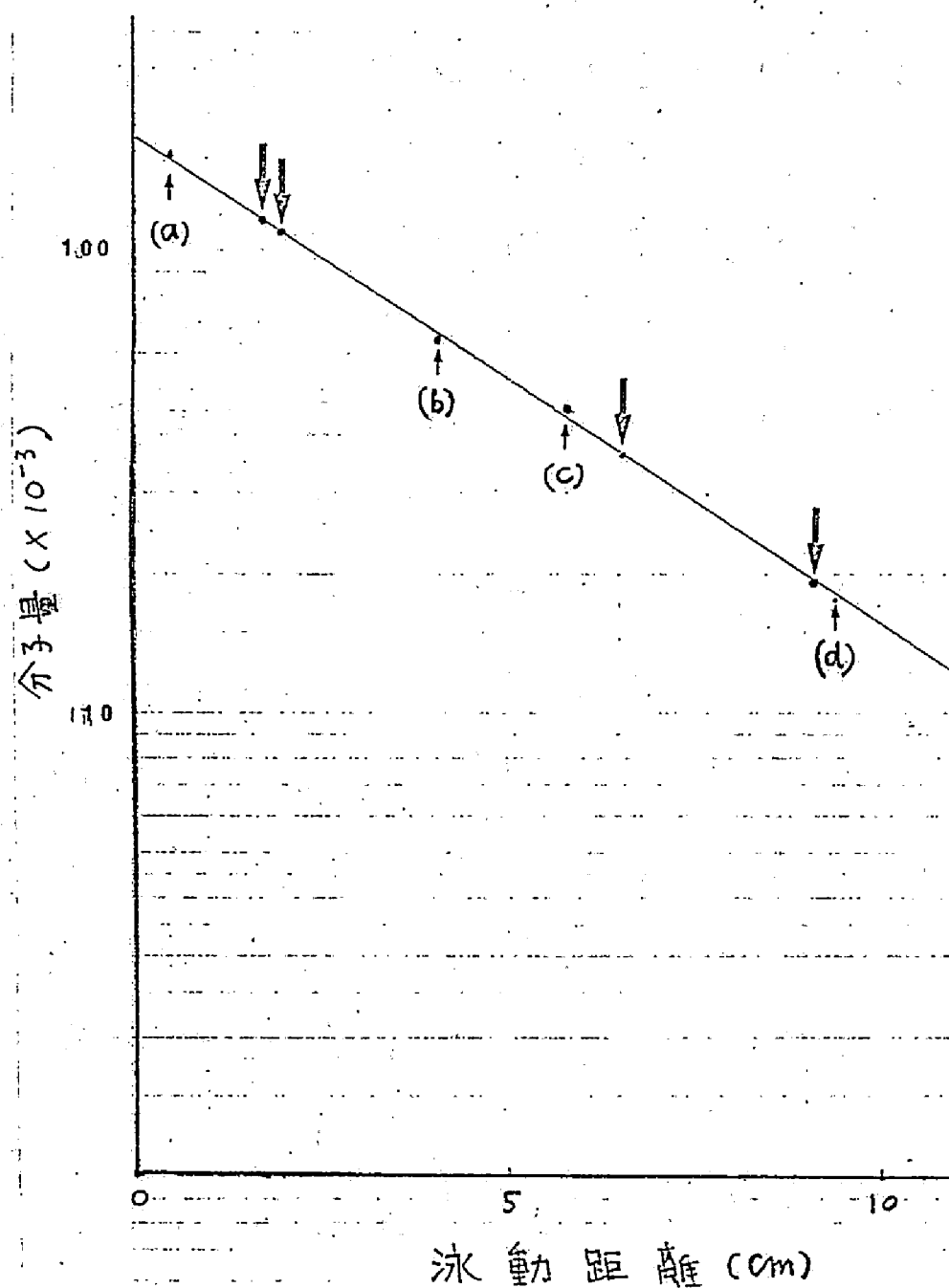


図23 BMV感染特異蛋白質の分子量測定

標準蛋白質 (a) γ -グロブリン (160 K), (b) 牛アルブミン (69 K)
 (c) 卵白アルブミン (45 K), (d) マイオグロビン (17.8 K)

太い矢印: BMV感染特異蛋白質 (図22による)。

ロプラスト量が少なくなった) 30~32時間パルスラベリングでもかなりはっきりと認められるが、他のバンドが濃い46~48時間パルスラベリングでは、それと同じかむしろ薄い。1,000g画分のフルオログラフでも20000g画分のそれとほぼ同様の結果が得られたが、ただ、P3のバンドは18~20時間パルスラベリングでは識別されず、24~26時間パルスラベリングで最初に認められた(図24)。全プロトプラスト蛋白質のフルオログラフを図25に示す。P4は7~9時間パルスラベリングですでに認められ、その後感染が進むにつれてその合成速度は増加した。P1は図25ではほとんど識別できなかったが、P2は感染非特異的バンドと重なり少し幅の広いバンドとして感染特異的に認められた。P3より少し低分子量の蛋白質バンドが感染プロトプラストに特異的に消えるように思われた。この点を再検討するため、同じ試料で量を2倍にし、電気泳動時間を少

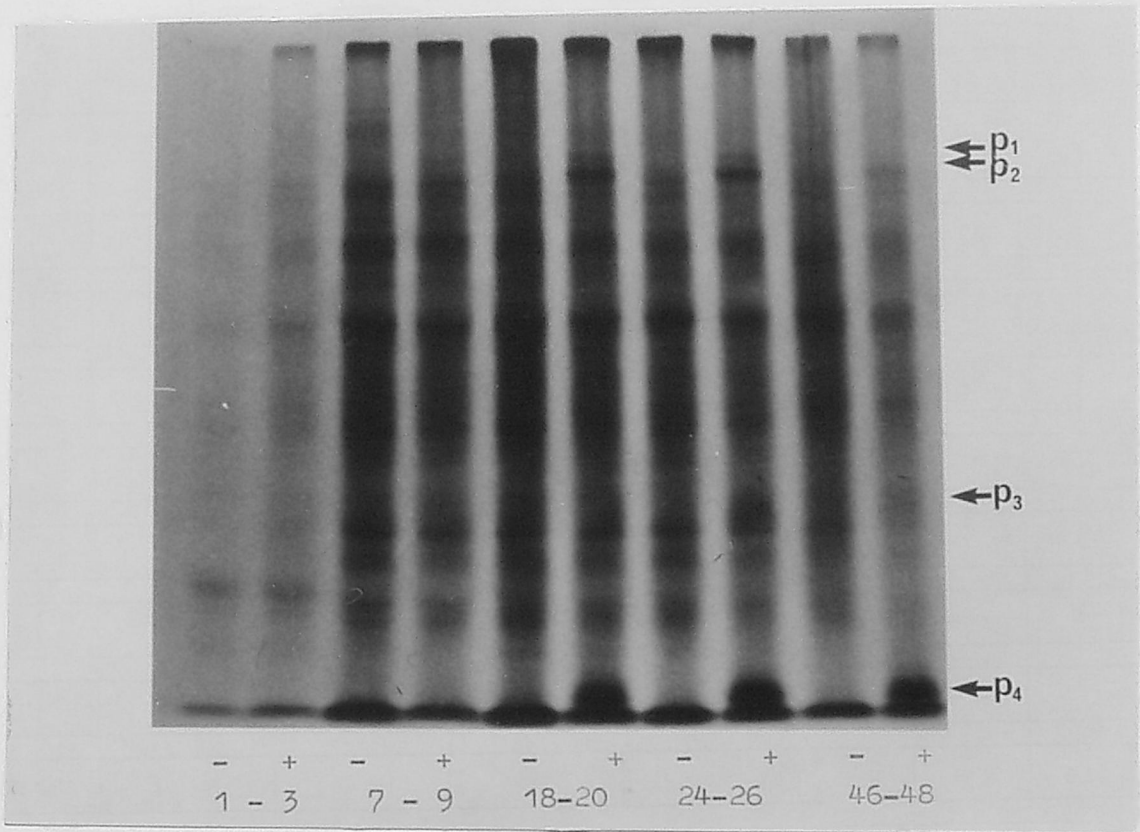


図24 BMV感染(+)と非感染(-)オオムギプロトプラストの1,000g画分蛋白質のフルオログラフ

その他の条件は図22参照

し長くして得たフルオログラフを図26に示す。非感染プロトプラストで認められる34キダルトン蛋白質のバンドが、感染プロトプラストでは消えることが確かめられた。このような現象は、20,000gと1000g沈殿画分ではほとんど認められなかったので、20000g上澄の可溶性蛋白質に起因するものと思われる。さらに図26は、P1とP2の合成速度が46~48時間より24~26時間パルスラベリングで高いことを示している。また、46~48時間パルスラベリングで感染プロトプラストに特異的に82Kと38キダルトンの蛋白質バンドが認められるが、82K蛋白質は同時期の非感染プロトプラストでも認められた(図25)ので感染特異的でない。なお、38K蛋白質が感染特異的であるかどうかについては明らかでない。

ポリアクリルアミドゲルのコマジューブリリアントブルーによる染色では、感染と非感染プロトプラストで差は認められなかった。ただ

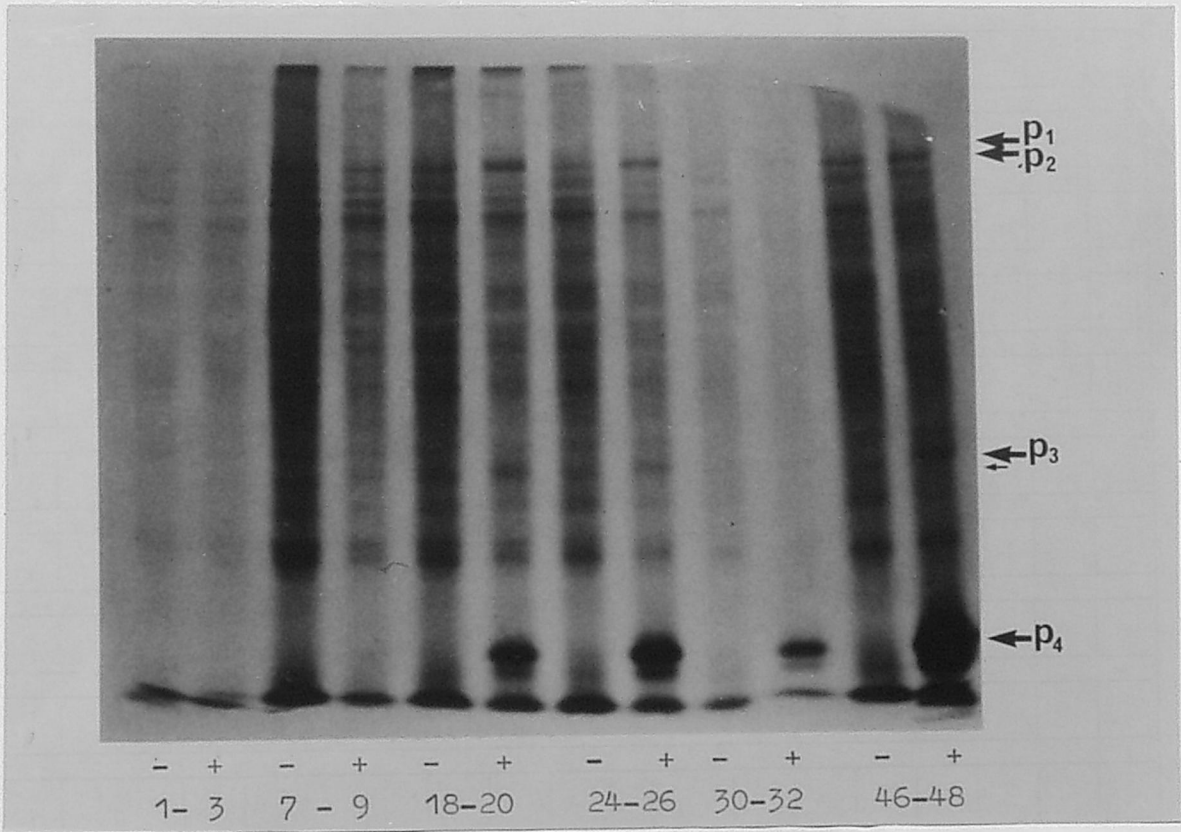


図25 BMV感染(+)と非感染(-)オオムギプロトプラスト
全蛋白のフルオログラフ

太い矢印：感染特異蛋白質
細い矢印：本文参照

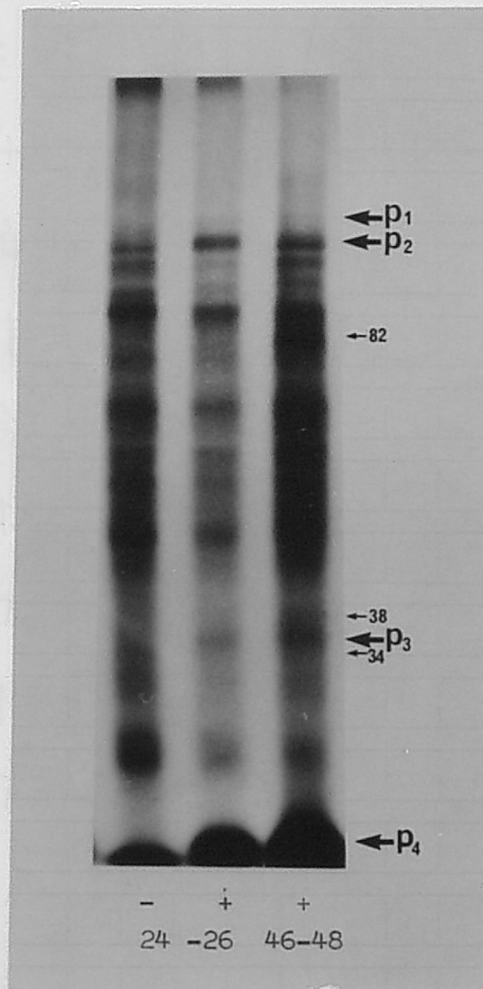


図26 BMV感染(+)と非感染(-)オオムギプロトプラスト全蛋白質のフルオログラフ

細い矢印と数値(分子量 $\times 10^{-3}$)は本文参照。

その他の条件は図22参照

し、全プロトプラスト蛋白質のゲルでは、プロトプラスト培養26時間でP4が感染特異的に認められ、その後そのバンドの濃度は増大した。また、P4はBMV粒子蛋白質（外被蛋白質）と同じ位置に泳動された。

BMV感染と非感染タバコプロトプラストにおける蛋白質合成

BMV接種とポリオルニチン（0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）処理したタバコプロトプラストを接種後2～4, 9～11, 18～20, 26～28, 34～36と47～49の2時間、3H-ロイシンでパルスラベリングを行い、オオムギプロトプラストと同様に蛋白質合成を分析した。9～11時間、18～20時間と26～28時間のパルスラベリングで、感染プロトプラストの20,000gと1,000g画分において、P1とP2は、それぞれの位置に比感染プロトプラストに比べ少し幅の広いバンドとして表われることで、その存在が確かめられた（図27と28）。しかし、全プロトプラスト蛋

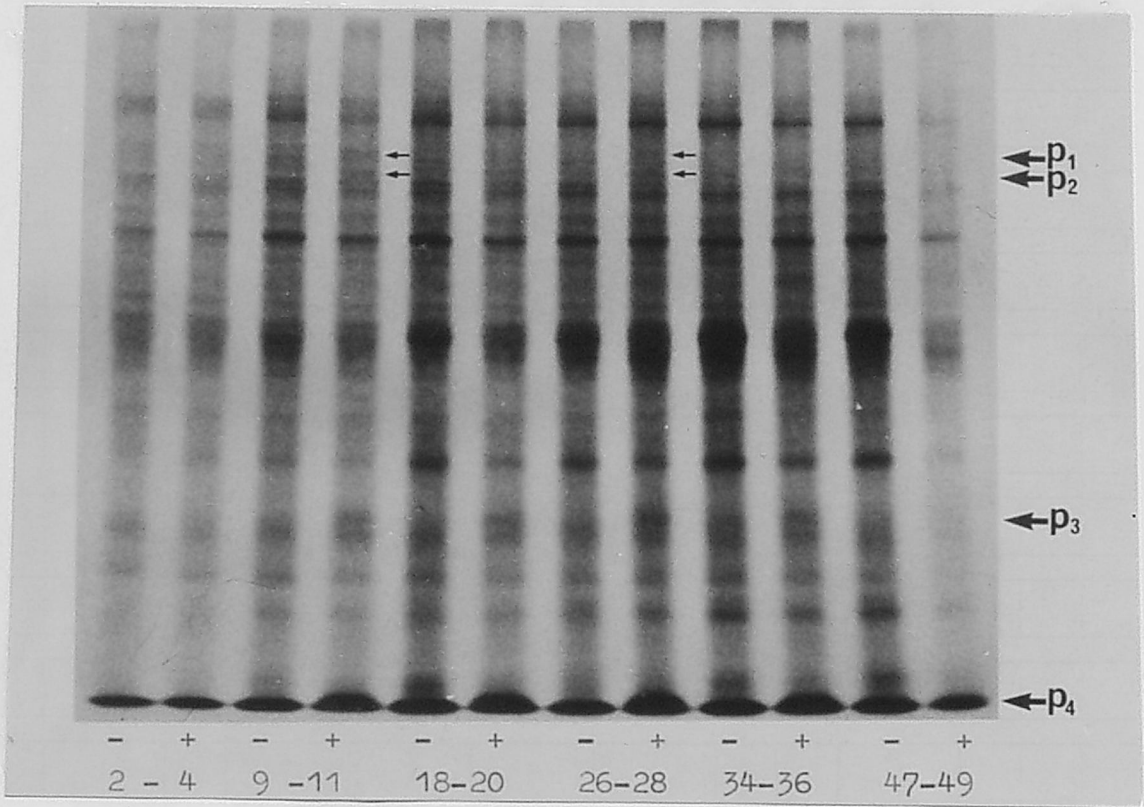


図 27 BMV 感染(+)と非感染(-)タバコプロトプラスト
膜結合 RNA ホリメラーゼ画分(20,000g 沈殿)蛋白質
のフルオログラフ

矢印は感染特異蛋白質

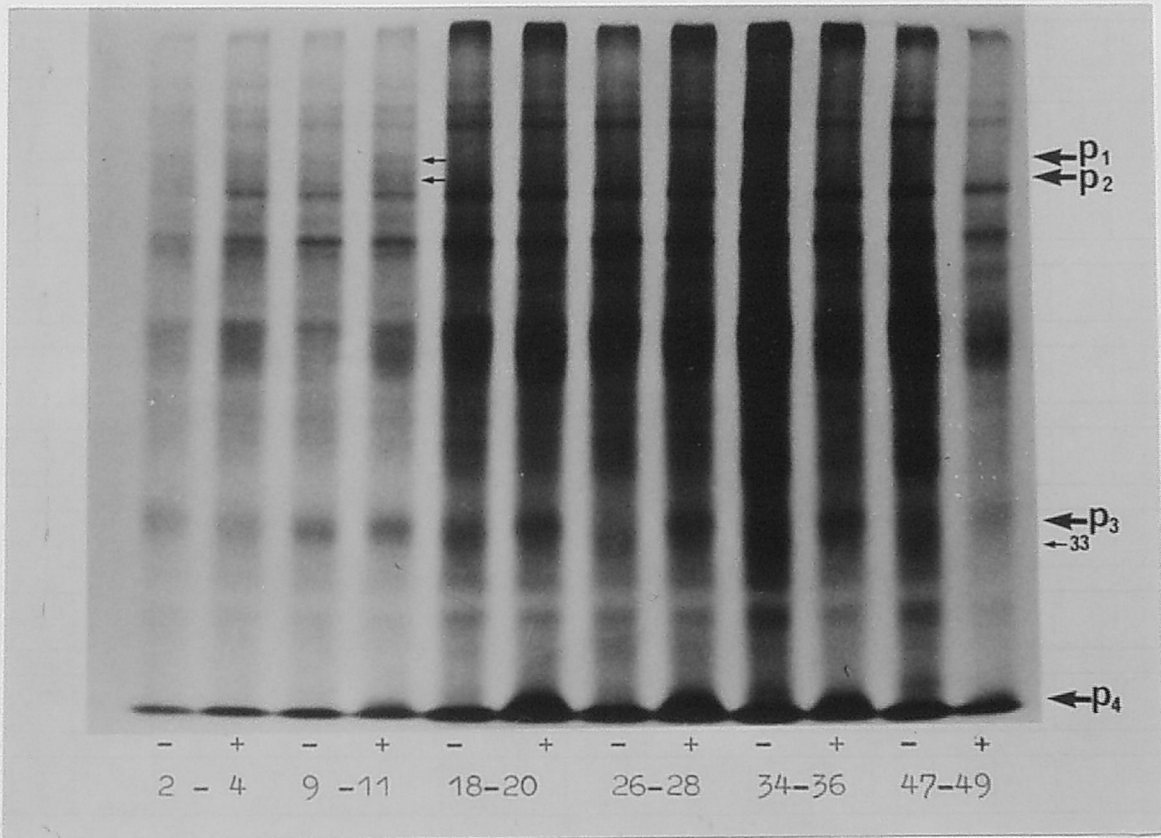


図 28 BMV感染(+)と非感染(-)タバコプロトプラスト
1,000g画分蛋白質のフルオログラフ

右側の細い矢印：本文参照

その他の条件は 図 27 参照

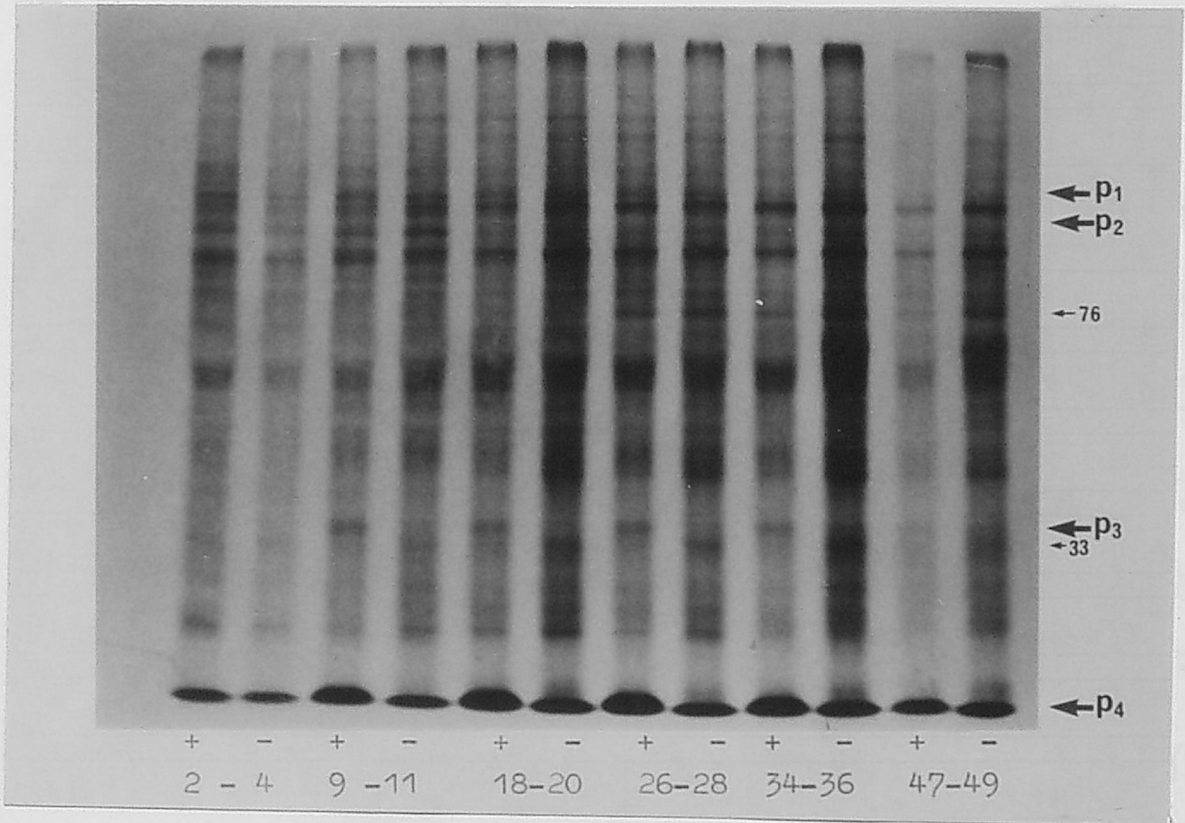


図29 BMV感染(+)と非感染(-)タバコプロトプラスト
全蛋白質のフルオログラフ

条件は図28参照

白質の分析では、それらを識別することは非常に困難であった(図29)。一方、P3に関しては、いずれの画分の蛋白質分析においても顕著に認められた。20,000gと全プロトプラスト画分では、9~11時間パルスラベリングで感染特異的に最初に認められ、その後のパルスラベリングでも同様に合成されるようであった(図27と29)。1,000g画分では、2~4, 9~11時間のパルスラベリングで感染・非感染両区とも、36Kダルトンの位置にバンドが認められたが、それ以後非感染プロトプラストでは36Kの位置のバンドは消え、新たに33Kの位置にバンドが現われた(図28)。全プロトプラスト画分でも、プロトプラスト培養に伴って、33Kダルトンの蛋白質が非感染プロトプラスト特異的に合成が促進されることがわかった(図29)。したがって、プロトプラストがBMV感染に関係なく合成しうる36Kと33Kダルトンの蛋白質は、プロトプラスト

培養によりそれぞれその合成の抑制と促進が起るが、少なくとも33Kダルトン蛋白質に関しては、BMV感染により特異的にその合成が抑制、阻害されたものと思われる。P4は感染特異的に9~11時間パルスラベリングから認められた。また、BMV感染に無関係に、プロトプラスト培養に伴って新たに合成される蛋白質が76Kの位置に認められた(図29)。

c. hybridum プロトプラストでのBMV感染特異的蛋白質合成

オオムギとタバコプロトプラストと同様に蛋白質合成を分析した結果、P1, P2, P3とP4がいずれも感染特異的に合成されることがわかった。

酸不溶蛋白質画分への³H-ロイシンの取り込み

オオムギとタバコプロトプラストいずれの場合でも、全蛋白質画分への取り込みがBMV感染により増大するという傾向は認められ

なかった(表32と33)。タバコプロトプラストの場合は、いずれのパルスラベル時期でも、合成された蛋白質の約80%が常に20,000g上澄画分に存在し、プロトプラストで合成された全蛋白質に対する20,000g上澄蛋白質の比率はBMV感染プロトプラストで非感染プロトプラストよりわずかに高かった(表33)。また、20,000g沈殿画分では、その関係が逆転した(表33)。

考 察

分子量が約120K, 110K, 36Kと19.5Kダルトンの少なくとも4種の蛋白質がBMV感染特異的に *in vivo* で合成されることが明らかになった。これら4種の蛋白質はおそらくウイルスRNAにコードされたものである。i) これら4種の蛋白質はBMV感染プロトプラストで合成されたが、ポリオルニチン処理されたプロトプラストでは合成されなかった。ii) これら4種の蛋白質の分子量は

表33 タバコプロトプラスト各細胞画分の酸
不溶画分への^{a)}3H-ロイシンの取り込み

ハルステベル (時間)	BMV 感染	1000g 沈殿	20,000g 沈殿	20,000g 上澄
2 - 4	-	3180 (6.6) ^{b)}	7432 (15.3)	37835 (78.1)
	+	5040 (7.6)	9160 (13.9)	51870 (78.5)
9 - 11	-	4608 (4.9)	12192 (13.1)	76330 (82.0)
	+	5430 (5.9)	9680 (10.7)	76160 (83.4)
18 - 20	-	9864 (6.9)	19608 (13.8)	113050 (79.3)
	+	7560 (5.8)	16992 (12.9)	107135 (81.3)
26 - 28	-	10494 (8.0)	18920 (14.6)	100485 (77.4)
	+	13974 (8.1)	21136 (12.2)	137620 (79.7)
34 - 36	-	16230 (10.0)	19680 (12.1)	126945 (77.9)
	+	11088 (8.4)	17048 (12.9)	103985 (78.7)
47 - 49	-	12540 (11.0)	18320 (16.2)	82145 (72.7)
	+	4530 (9.2)	5288 (10.7)	39655 (80.1)

a) 各細胞画分を破壊緩衝液処理後、その一部を測定し、全体量を算出した。

() は細胞全体の取り込み量を100としたときの % である。

in vitro コムギ胚蛋白質合成系で4種のBMV RNAよりそれぞれ翻訳されるポリペプチドの分子量¹⁰⁰⁾とほぼ完全に一致した。iii)植物体レベルでBMV感染に対する反応の異なる3種の植物のプロトプラストで、これら4種の蛋白質だけが共通して、BMV感染特異的に合成された。

今まで植物体組織レベルでの研究では、外被蛋白質以外で、BMV感染特異的に合成が検出されたのは、34.5Kダルトンの蛋白質(おそらく、ここでの36K(P3))³⁵⁾だけである。³⁵⁾ Hariharasubramanian³⁵⁾らは、34.5K蛋白質がRNAポリメラーゼ活性を持つ細胞画分に存存し、RNAポリメラーゼ活性の増高に先だつ時期にのみ検出されたことより、RNAポリメラーゼの構成成分の一つであろうと考えた。P1、P2とP3のウイルス増殖過程における役割についてはここでも推測の域を越えないうが、それらがBMV RNAポリメラーゼそれ自身またはその構成成分である可能性

はつぎのような実験事実より示唆される。外核蛋白質であるP4は感染が進行するに従ってその合成活性は高まったが、P1、P2とP3の合成活性はP4よりも早く高まり、P4の合成活性が最大になる感染後期には感染初期に比べむしろ低下した。また、これらの蛋白質合成速度とRNAポリメラーゼ活性の感染時期における増減はほぼ一致した（本章、第2節参照）。P4は全プロトプラスト画分で、P1、P2とP3は膜結合RNAポリメラーゼ画分で、最も顕著に認められた。

Hadidi と Frankel-Conrat³⁴⁾ は解離していないBMV RNAポリメラーゼの分子量を150Kダルトンと推定したが、120K (P1) あるいは110K (P2) と36K (P3) 蛋白質の複合体を想定すると、よく一致する。

Siegel¹⁰²⁾ は、TMV-タバコプロトプラスト系で、植物側の蛋白質合成活性がウイルス感染によりほとんど影響されず、ウイルス特異的蛋白質合成は通常の代謝に加えて起ると考

えた。しかし、BMV感染オオムギあるいはタバコプロトプラストでは、非感染プロトプラストに比べ特に蛋白質合成量が増大する傾向は見られなかったので、プロトプラスト当りの蛋白質合成能力はむしろ一定であると考えられる。このことは、オオムギとタバコプロトプラストでいくつかの蛋白質の合成がBMV感染により抑制、あるいは阻害されたことから支持される。また、BMVRNA⁴は *in vitro* 蛋白質合成系で、他の3種のBMVRNAの翻訳をほぼ完全に抑制する。^{99,100)} したがって、そのような蛋白質合成過程における競合機構が *in vivo* でも存在し、BMVRNAが植物側のmRNAの翻訳効率を低下させることも十分考えられる。しかし、同時に、¹⁰²⁾ Siegelらの結果との矛盾は、TMVとBMVの増殖機構、あるいは用いたプロトプラストの生理活性の差による可能性はある。

第Ⅳ章 総 合 考 察

植物ウイルスの感染、増殖機構の研究において、プロトプラスト系は従来の植物葉組織レベルでの研究に比べて、多くの利点を持っている。まず、プロトプラスト系では *in vitro* でウイルスが接種された場合、*in vivo* 増殖過程の解析に欠かせないウイルスの同調的増殖が可能となることである。^{2, 36, 62, 63, 75, 85, 109)} また、同時に感染が高率に起こるため、ウイルスの脱外被蛋白質過程をはじめ、感染のごく初期過程を詳しく時間を追って解析することもできる。¹¹²⁾ さらに、プロトプラストはピペットによる操作も可能であり、実験時の条件を非常に正確に限定でき、アイソトープを用いたトレーサー実験をはじめ、多くの薬剤のウイルス増殖に及ぼす影響を研究するのも容易である。^{1, 2, 3, 85, 105, 113)} プロトプラストは細胞壁を持っていないため、ここからの物質の抽出は比較的容易である。

プロトプラスト系でウイルスの研究をするためには、少なくとも研究に必要な高いウイ

ルス増殖を維持できる活性を持ったプロトプラストを、常時、多量に、得る必要がある。建部らによりタバコプロトプラストの分離・培養の基本的条件が確立されて以来⁽¹⁰⁸⁾、多数の研究者により独自の方法でプロトプラストの分離が試みられてきた⁽¹⁰⁵⁾。しかし、その分離は用いる植物の状態によって大きく影響される。とくに単子葉植物の場合、その影響が大きく、植物生育時の各種要因のどれか一つが不十分でも、活性の高いプロトプラストを得ることが困難である。第Ⅱ章第2節で述べた方法は、単子葉植物プロトプラスト系での研究に、今後大きく貢献するものである。

プロトプラスト系におけるウイルス感染機構の研究は、ウイルス学のみならず遺伝子工学の分野においても、今後重要な問題を提供するであろう。プロトプラストへのウイルスの感染が生物的現象か物理的現象かについてこれまで2つの意見が主張されてきた。建部らのグループは、TMVあるいはCMV-タ

バコプロトプラスト系での研究で、その感染
 がポリカチオンにより促進されること、ウイ
 ルス粒子を含む飲細胞運動的細胞膜陷入構造
 が観察されることより、感染過程が動物細胞
 で見られるようなエネルギー依存の生物的現
 象として説明され^{37, 39, 40, 81)}とした。一方、Burgess⁵の
 グループは、ポリカチオン処理でプロトプ
 ラスト膜に局部的破壊が生じることより、そ
 のような膜の切れ目からウイルスが細胞内へ
 取り込まれると考え、感染は単なる物理現象
 で説明でき^{14, 15, 62)}るとした。しかし、少なくともオ
 オムギプロトプラストのBMVによる感染は、
 そのいずれの機構によっても説明できなかつ
 た。BMVのように高い等電点(pH 7.9)
 を持つウイルスを用いることにより、感染は
 接種源のもつ正電荷の強さに比例して起るこ
 とが明らかにな⁷¹⁾った。また、接種時の浸透圧
 ショック⁷²⁾と感染に及ぼす温度の影響を考え合
 せると、BMV感染は非常に物理的な要因に
 よりコントロールされていることがわかった。

プロトプラスト膜上にウイルス粒子に吸着されやすい、いわゆる感染部位が存在するかどうかにについては明らかでないが、浸透圧増加ショックは少なくともプロトプラスト膜を収縮させて、BMV粒子が膜に強く吸着しやすい部位を形成するか、ウイルス吸着部位での細胞膜の陥入を促進するような変化を膜に与えるようであった。正に荷電した物質が作用した場合、細胞膜にどのような変化が生じるかは、まだまったくといってよいほどわかっていない。⁸⁸⁾ ウイルス感染機構と膜の構造及びその性質との関係は、今後残された大きな問題であろう。

一般に、組織レベルではウイルス感染により細胞死が起り、局部病斑が形成される植物、あるいは植物体レベルでは感染がまったく起らないと考えられている植物においても、そこからプロトプラストを分離し、*in vitro* で接種を行うと、ウイルス感染が高率に起り、細胞死を起さずにウイルスはプロトプラスト中

で増殖する。T M V トマト系と T M V 抵抗性
 トマトと、B M V とダイコンの組合せでは、
 表皮細胞で感染が認められることより、少な
 くともウイルスの細胞間移行を組織レベルで
 は問題にしなければならない。また、プロト
 プラスト化が細胞の生理活性とその代謝を変
 化させ、そのことがウイルス増殖に影響する
 ことも十分考えられる。たとへば、そのよう
 な変化としては、高張液処理プロトプラスト
 での R N a s e 活性^{4, 89, 93)}とパーオキシダーゼ活性⁶⁰⁾の増大
 が知られている。また、プロトプラスト培養
 に伴って、ある種の蛋白質の合成量の増加と
 減少、あるいは *de novo* 合成が起ることは、第
 四章、第3節の結果から明らかである。

ウイルス R N A によるプロトプラストの最
 適感染条件が、プロトプラストでの R N a s e の
de novo 合成とその活性を抑制する条件と一致
 したことより、細胞中の R N a s e が R N A 感
 染に影響する最も大きな因子の一つであるこ
 とは明らかである。ここで述べた条件では、

プロトプラスト当り約100分子のRNAで感染が成立することが明らかになった。このことは、遺伝物質をその活性を維持した状態で非常に効率よく細胞に取り込ませることが可能になったことを意味している。今後、植物生理学的にも、育種学的研究にとっても、非常に有効な手段となることが期待できる。

植物および動物RNAウイルスのかなりのものが多分節ゲノムを持つことが明らかにされてきた。⁽¹²⁾ 植物ウイルスでは、ゲノムが2分子のRNAからなる2分節系⁽¹³⁾と、3分子のRNAからなる3分節系⁽¹¹⁾に大きく分けることができる。2分節系は、タバコラトルウイルス

を含む Tobravirus グループとCPMVを含む

Comovirus グループに代表され、3分節系はB

MVを含む Bromovirus グループ、キューリモ

ガイクウイルスを含む Cucumovirus グループと

アルファルファモガイクウイルスに代表される。

これら多分節ゲノムを持つウイルスの進化的な起源については全く明らかでないが、

いずれの場合も、最も分子量の小さなゲノム構成RNAあるいはそれより派生したと思われるさらに小さなRNAに外被蛋白質の情報が含まれていることは興味深い。植物および動物のDNAウイルスでは、このような多分節ゲノムを持つウイルスはまだ発見されていない。¹¹⁾ また、RNAではDNAに見られるような分子間の組換え機構は知られていない。¹²⁾ したがって、RNAウイルスの場合、遺伝情報を別々のRNA分子に分散して持つことで、遺伝情報の交換が容易になり、今日のRNAウイルスの多くが多分節ゲノムを持つようになった可能性がある。^{5,6)} また、真核生物では、一般に、原核生物に見られるようなmRNAのポリシストロニックな翻訳はまれであるので、ウイルスRNAも多分節構造をとることにより、モノシストロニックな蛋白質翻訳機構に適応したのであろう。

ゲノム自身がmRNAであるようなRNAウイルスの場合、RNAファージではウイル

スRNAがポリシストロニックmRNAとして働き、RNAの高次構造がそれぞれのシストロンの翻訳をコントロールする。^{28, 103)} ポリオウイルスによって代表される Picornavirus グループのウイルスRNAはポリシストロニックmRNAであるが、まず一つの高分子ポリペプチドに翻訳された後、¹⁰³⁾ post-translational processing によりいくつかの小さなポリペプチドに分節されて、それぞれ機能を持つ蛋白質ができる。植物ウイルスの場合、たとえばTMV感染で特異的に合成される蛋白質は3種知られて¹⁰²⁾ いるが、少なくとも外被蛋白質はゲノムRNAより小さなRNAがmRNAとして働くことで^{41, 101)} 翻訳される。一方、BMVの4種のRNAが¹⁰⁰⁾ in vitro 蛋白質合成系でそれぞれモノシストロニックmRNAとして働くことは知られていたが、¹⁰⁰⁾ in vivo でも同様に作用することが、ここで証明された。

BMVゲノムを構成するRNA1, RNA2とRNA3を接種すると、RNA4は増殖

55)

過程で必ず再生される。RNA₄と相同塩基配列を含むRNA₃よりのその再生機構に関しては、まだ定説がない。しかし、RNA₄の二本鎖RNAを分離できたという報告⁷⁾もあり、RNA₃より部分的に転写されたRNA₄が自己複製過程を経て再生されるものと考えられる。外被蛋白質以外の3種の蛋白質、すなわちBMV RNA 1, 2と3にそれぞれコードされている分子量120K, 110Kと36Kダルトンの蛋白質の機能については、まだほとんどわかっていない。しかし、それらがウイルスRNA複製酵素あるいはその構成成分である可能性を筆者の実験結果は強く示唆している。RNAファージの場合、ウイルスのコードしている3種の蛋白質の1つが、細菌の本来持っている3種の蛋白質と複合体を形成して、ウイルスRNA特異複製酵素として働くことが知られている^{44, 50)}。真核生物で同様の機構が存在するかどうかについてはわかっていない。植物の場合、ウイルスに感

染すると、一般に、アクチノマイシンに影
 響されないRNAポリメラーゼ活性が著しく
 増加する。^{25, 34, 58, 74, 87, 96, 104)}一方、健全植物にもRNA依存R
 NAポリメラーゼ活性が存在することが、最近
 明らかにされてきた。^{25, 58, 87, 104)}しかし、ウイルス感染
 によるRNAポリメラーゼ活性の増大が、植
 物の持っている酵素の活性化によるものかど
 うかにういては、今後の研究に待たねばならな
 い。

植物ウイルスは主にRNAをゲノムとして
 持っているので、DNAウイルスで見られる
 ような遺伝的組換え現象は非常にまれで、遺
 伝学的解析は非常に困難であると思われる。
 しかし、遺伝子をシストロン単位で独立した
 RNA分子に持つ多分節ゲノムウイルスを用
 いることにより、遺伝子単位での組換えはお
 しろ容易である。このことは、とくにプロト
 プラストのウイルスRNAによる感染系が確
 立された⁷³⁾(第V章)ことで、同一細胞内での
 ウイルス増殖過程における、遺伝子レベルで

の解析が今後可能となったことを意味する。
また、プロトプラスト系では、少なくとも植物組織レベルでのウイルス-植物間の特異性がなくなり、これまでより広い範囲で、ウイルス種間の相互作用の研究も可能となった。^{30,31)} このことは、逆に、ウイルス-植物間の特異性解明に重要な鍵を与えるものと思う。

第四章 摘 要

植物ウイルスの感染・増殖機構およびその過程を解析するためには、ウイルスの同調的な感染・増殖の起る系での研究が望まれる。プロトプラスト系はそのような条件を満たすものである。筆者はブロムモザイクウイルス(BMV)の一段増殖を可能とするプロトプラスト系を確立し、BMVの感染・増殖過程の研究を行った。

1. BMVの全身病斑植物であるオオムギ、コムギ、カラスムギとトウモロコシから葉肉細胞プロトプラストの分離を行った。播種後6~8日目のオオムギ、コムギとカラスムギのカ1葉、約2週間目のトウモロコシのカ1葉とカ2葉の背軸側表皮をはく離し、1%セルラーゼを含む0.5マンニトール溶液、pH 5.6で22~26℃、2~3時間の振とう処理を行った。1gの生葉より $1.5 \sim 6 \times 10^6$ 個のプロトプラストが分離でき、その90%

以上は形態的に完全に正常なプロトプラストで、少なくとも3日間の培養に耐えた。

2. タバコ, ダイコン, *Chenopodium hybridum* からも効率良く葉肉細胞プロトプラストが分離できた。裏表皮をはく離した葉を1%セルラーゼと0.05%マセロザイムを含む0.5Mマンニトール溶液に浮かせ、30°C, 3時間の処理ですべての葉肉細胞をプロトプラストとして得ることができた。ただし、ダイコンの場合は、酵素処理を26°Cで行った。

3. プロトプラストのBMV粒子による感染は2つの異った様式で起った。一つは低いpH, 低いイオン強度でのポリカチオン非依存性の感染で、もう一つは高いpH, 高いイオン強度でのポリカチオン依存性の感染であった。プロトプラストのBMV感染は、低いpHではBMV粒子自身の正電荷, また高いpHではウイルス-ポリカチオン複合体の正電荷の

強さに比例して起ると考えられた。

4. プロトプラストのBMV粒子による感染は接種時のマンニトール濃度の変化による浸透圧ショックの影響を受けた。接種直前に浸透圧増加ショックを与えると感染率は著しく増加した。逆に浸透圧減少ショックを与えるとプロトプラストはほとんどBMVに感染しなかった。0.5 M マンニトールで分離したプロトプラストを0.7 M マンニトールを含む0.1 mM クエン酸緩衝液, pH 5.0 を用い, 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ポリオールニチン存在下において20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BMV で接種すると, 常時70~95% のプロトプラストがBMVに感染した。

5. BMV接種プロトプラストの走査電子顕微鏡による観察で, 高率に感染の起る条件とプロトプラストに付着されるウイルス量が相関していることがわかった。また, 10 mM CaCl_2 処理でプロトプラストは収縮した。

透過電子顕微鏡による観察では、多数のBMV粒子がプロトプラスト膜に付着していたが、そのうちの一部の粒子だけが強く膜に吸着して細胞膜の陥入を誘導しているようであった。浸透圧増加ショックを与えたプロトプラストでは、BMV粒子を含む飲細胞運動的細胞膜陥入構造と、その結果生じたと思われる小胞が観察されたが、浸透圧減少ショックを与えたプロトプラストにはいずれの構造も認められなかった。感染が0℃でも効率良く起ることも考え合せると、飲細胞運動的膜陥入は生理的なものであるよりむしろ物理化学的作用の結果生じたと考えられる。

7. 植物体レベルでBMV感染の起らないと思われる植物（ダイコン、タバコ）も、そこから分離したプロトプラストに *in vitro* でBMVを接種すると高率に感染が起り、全身病斑植物のオオムギプロトプラストと同様にウイルス増殖が起った。しかし、ダイコンの場合は

接種葉表皮細胞でBMV感染が認められた。

このことは、ダイコン組織ではBMVの細胞間移行を妨げる何らかの機構が存在することを示している。

8. プロトプラストのウイルスRNAによる感染で最も重要な因子の一つは、プロトプラスト分離・接種時のマンニトール濃度であった。プロトプラストを正常な状態で維持できる最低濃度のマンニトール溶液を用いることにより、高率にRNA感染が起った。他の条件は、 $0.1 \sim 1 \mu\text{g/ml}$ のウイルスRNAを用い、 $1 \mu\text{g/ml}$ ポリオルニチンと 0.5 mM CaCl_2 を含む 20 mM クエン酸緩衝液、 $\text{pH } 4.7$ で 0°C 、 15 分処理し、その後 10 mM CaCl_2 を含む 0.7 M マンニトールで洗淨することであった。これらの条件はプロトプラスト中のRNase活性を抑制し、ウイルスRNAとポリオルニチン複合体の正電荷を最大にすると考えられる。

9. BMVの増殖はシクロヘキシミドで阻害されたが、クロラムフェニコールの影響は受けなかった。このことから、ウイルス増殖に必要な蛋白質合成は80S細胞質リボソーム系に依存することがわかった。

10. BMVのプロトプラストでの増殖は暗黒期を経て、接種6~9時間後より指数関数的に増加し、26時間後でほぼ飽和に達した。このことはBMVがプロトプラスト中で同調的に増殖したことを意味している。

11. BMV粒子とRNAの接種による増殖曲線の比較より、RNA接種では、粒子の場合に必要とされる脱外被蛋白質のような過程が省かれるためか、増殖曲線の立ち上がりが粒子の場合より早かった。

12. BMV感染特異的膜結合RNAポリメラーゼ活性はアクチノマイシンD抵抗性で、

ATP, GTP, CTP, UTPの存在に依存し、外生的に加えられたBMV RNAには依存しなかった。その酵素活性は、少なくとも接種7時間後に認められ、その後急激に増加し、接種30時間後をピークにしてその後徐々に減少した。

13. RNAポリメラーゼ活性はBMV RNA 1, 2と3を混合接種したときに最も高率に誘導された。RNA 3あるいはRNA 4の接種では、RNAポリメラーゼ活性はまったく誘導されなかった。RNA 1 + RNA 2の画分にはまだRNA 3の混存によると思われる感染性があり、RNAポリメラーゼ活性もわずかに誘導された。しかし、その感染性と酵素活性はRNA 3の添加により著しく増大した。したがって、RNAポリメラーゼ活性を誘導するにはRNA 1, 2と3にコードされているすべての蛋白質が関与しているものと考えられる。

14. B M V 感染プロトプラストでは分子量約 120K, 110K, 36K と 19.5K ダルトンの4種の蛋白質が感染特異的に合成された。これらの蛋白質が B M V RNA にコードされたものであることが次の実験結果より示唆された。i) B M V 感染プロトプラストで特異的に合成された。ii) *in vitro* コムギ胚蛋白質合成系で B M V RNA 1, 2, 3 と 4 からそれぞれ翻訳される蛋白質の分子量とほぼ完全に一致した。iii) オオムギ, タバコ と *C. hybridum* いずれのプロトプラストでも, これら4種の蛋白質だけが共通して感染特異的に合成された。

15. B M V 外被蛋白質以外の 120K, 110K と 36K ダルトンの蛋白質は B M V の RNA ポリメラーゼ自身あるいはその構成成分である可能性が次の実験結果から示唆された。i) これらの蛋白質は膜結合 RNA ポリメラーゼ画分で最も顕著に検出された。ii) これら

の蛋白質の合成速度はRNAポリメラーゼ活性の増減と相関関係にあった。iii) RNAポリメラーゼ活性は120K, 110Kと36Kダルトンの蛋白質がそれぞれコードされているRNA1, RNA2とRNA3の混合接種で最も顕著に誘導された。iv) Hadidi と Frankel-Conrat (1973) が分離したBMRNAポリメラーゼの分子量150Kダルトンは、筆者の得た120Kあるいは110Kと36Kの複合体の分子量とよく一致する。

引用文献

- 1 Alblas, F. and J. F. Bol. 1977: J. Gen. Virol. 36, 175-185.
- 2 Aoki, S. and I. Takebe. 1969: Virology 39, 439-448.
- 3 Aoki, S. and I. Takebe. 1975: Virology 65, 343-354.
- 4 Arakawa, Y., T. Okuno. and I. Furusawa. 1979: Ann. Phytopath. Soc. Japan (Abstr.) (in press).
- 5 Bancroft, J. B. 1972: J. Gen. Virol. 14, 223-228.
- 6 Bancroft, J. B. and L. C. Lane. 1973: J. Gen. Virol. 19, 381-389.
- 7 Bastin, M. and P. Kaesberg. 1976: Virology 72, 536-539.
- 8 Beier, H. and G. Bruening. 1976: Virology 72, 363-369.
- 9 Bockstahler, L. E. and P. Kaesberg. 1962: J. Biophysics 2, 1-9.
- 10 Bockstahler, L. E. and P. Kaesberg. 1965: Virology 27, 418-425.
- 11 Bockstahler, L. E. and P. Kaesberg. 1965: J. Mol. Biol. 13, 127-137.
- 12 Bonner, W. M. and R. A. Laskey. 1974: Eur. J. Biochem. 46, 83-88.
- 13 Bruening, G. 1977: In "Comprehensive Virology" 11, 55-130
(H. Frankel-Conrat and R. R. Wagner., Eds), Plenum Pub. Co.
New York.
- 14 Burgess, J., F. Motoyoshi. and E. N. Fleming. 1973: Planta 111,
199-208.
- 15 Burgess, J., F. Motoyoshi. and E. N. Fleming. 1973: Planta 112,
323-332.
- 16 Cocking, E. C. 1960: Nature 187, 927-929.
- 17 Cocking, E. C. 1972: Ann. Rev. Physiol. 23, 29-55.
- 18 Coutts, R. H. A. 1978: Pl. Sci. Letters 12, 77-85.
- 19 Davis, J. W. and P. Kaesberg. 1974: J. Gen. Virol. 25, 11-20.
- 20 Duesberg, P. H. 1968: Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 59, 930-937.
- 21 Ellis, E. L. and M. Delbruck. 1939: J. Gen. Physiol. 22, 365-

- 22 Engelhardt, D. L. and N. D. Zinder. 1964: Virology 23, 582-587.
- 23 Esau, K., J. Cronshaw. and L. L. Hoefert. 1967: J. Cell Biol.
32, 71-87.
- 24 Evans, P. K., A. G. Keates. and E. C. Cocking. 1972: Planta 104,
178-181.
- 25 Frankel-Conrat, H. 1976: Virology 72, 23-32.
- 26 Frankel-Conrat, H. and M. Salvato. 1977: In " Comprehensive
Virology" 11, 201-235, (H. Frankel-Conrat and R. R. Wagner.,
Eds.), Plenum Pub. Co. New York.
- 27 Fuchs, Y. and A. W. Galston. 1976: Plant & Cell Physiol. 17,
475-482.
- 28 Fukami, H. and K. Imahori. 1971: Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 68,
570-573.
- 29 Fukunaga, K., T. Okuno. and I. Furusawa. 1978: Ann. Phytopath.
Soc. Japan 44, 391-392 (Abstr.).
- 30 Furusawa, I. and T. Okuno. 1978: J. Gen. Virol. 40, 489-491.
- 31 Furusawa, I., T. Okuno. and K. Fukunaga. 1978: 4th Int. Nat.
Cong. Virol. (the Hague), 260 (Abstr.).
- 32 Gomatos, P. J. and I. Tamm. 1963: Proc. Nat. Acad. Sci. USA.
49, 709-714.
- 33 Grout, B. W. W. and R. H. H. Coutts. 1974: Pl. Sci. Letters.
2, 397-403.
- 34 Hadidi, A. and H. Frankel-Conrat. 1973: Virology 52, 363-372.
- 35 Hariharasubramanian, V., A. Hadidi., B. Singer. and H. Frankel-
Conrat. 1973: Virology 54, 190-198.
- 36 Hibi, T., G. Rezelman. and A. Van Kammen. 1975: Virology 64,
308-318.
- 37 Hibi, T. and K. Yora. 1972: Ann. Phytopath. Soc. Japan 38, 255-257.
- 38 Hiruki, C. 1969: J. Virol. 3, 498-505.

- 39 Honda, Y., S. Kajita., C. Matsui., Y. Otsuki. and I. Takebe.
1975: *Phytopath. Z.* 84, 66-74.
- 40 Honda, Y., C. Matsui., Y. Otsuki. and I. Takebe. 1974: *Phytopathology*
64, 30-34.
- 41 Hunter, T. R., T. Hunt., J. Knowland. and D. Zimmern. 1976:
Nature 260, 759-764.
- 42 Incardona, N. L., S. McKee. and J. B. Flanagan. 1973: *Virology*
53, 204-214.
- 43 Jaspers, E. M. J. 1974: *Adv. Virus Res.* 19, 37-149.
- 44 Kamen, R. 1970: *Nature* 228, 527-533.
- 45 Kao, K. N., F. Constabel., M. R. Michayluk. and O. L. Gamborg.
1974: *Planta* 120, 215-227.
- 46 Kanai, R. and G. E. Edwards. 1973: *Plant Physiol.* 52, 484-490.
- 47 Kawamura, A. 1967: *Pro. Nuc. Enz.* 11, 1621-1637.
- 48 Koch, G. 1973: *Cur. Topics Microbiol. Immunol.* 62, 89-138.
- 49 Koch, G. 1963: *Z. Naturforsch.* 18, 899-902.
- 50 Kondo, M., R. Gallerani. and C. Weismann. 1970: *Nature* 228, 525-527.
- 51 Kubo, S., D. J. Robinson., B. D. Harrison. and A. M. Hutcheson.
1976: *J. Gen. Virol.* 30, 287-298.
- 52 Kummert, J. and J. Semal. 1972: *J. Gen. Virol.* 16, 11-20.
- 53 Kummert, J. and J. Semal. 1974: *Virology* 60, 390-397.
- 54 Laemmli, U. K. 1970: *Nature* 227, 680-685.
- 55 Lane, L. C. 1974: *Adv. Virus Res.* 19, 151-220.
- 56 Lane, L. C. and P. Kaesberg. 1971: *Nature New Biol.* 232, 40-43.
- 57 Laskey, R. A. and A. D. Mills. 1975: *Eur. J. Biochem.* 56, 335-341.
- 58 Le Roy, C., C. Stussi-Garaud. and L. Hirth. 1977: *Virology* 82,
48-62.

- 59 Loening, U. E. 1967: Biochem. J. 102, 251-257.
- 60 Mäder, M., M. Meyer. and M. Bopp. 1976: Planta 129, 33-38.
- 61 Motoyoshi, F., J. B. Bancroft. and J. W. Watts. 1974: J. Gen. Virol. 25, 31-36.
- 62 Motoyoshi, F., J. B. Bancroft., J. W. Watts. and J. Burgess. 1973: J. Gen. Virol. 20, 177-193.
- 63 Motoyoshi, F. and R. Hull. 1974: J. Gen. Virol. 1974: J. Gen. Virol. 24, 89-99.
- 64 Motoyoshi, F., R. Hull. and I. H. Flack. 1975: J. Gen. Virol. 27, 263-266.
- 65 Motoyoshi, F. and N. Oshima. 1975: J. Gen. Virol. 29, 81-91.
- 66 Motoyoshi, F. and N. Oshima. 1976: J. Gen. Virol. 32, 311-314.
- 67 Motoyoshi, F. and N. Oshima. 1977: J. Gen. Virol. 34, 499-506.
- 68 Nagata, T. and I. Takebe. 1970: Planta 92, 301-308.
- 69 Nishiguch, M., F. Motoyoshi. and N. Oshima. 1978: Ann. Phytopath. Soc. Japan 44, 385 (Abstr.).
- 70 Okuno, T. and I. Furusawa. 1977: Plant & Cell Physiol. 18, 1357-1362.
- 71 Okuno, T. and I. Furusawa. 1978: J. Gen. Virol. 38, 409-418.
- 72 Okuno, T. and I. Furusawa. 1978: J. Gen. Virol. 39, 187-189.
- 73 Okuno, T. and I. Furusawa. 1978: J. Gen. Virol. 41, 63-75.
- 74 Okuno, T. and I. Furusawa. 1979: Virology (in press).
- 75 Okuno, T., I. Furusawa. and C. Hiruki. 1977: Phytopathology 67, 610-615.
- 76 Okuno, T., T. Miki. and I. Furusawa. 1975: Ann. Phytopath. Soc. Japan 41, 293-294 (Abstr.).
- 77 Otsuki, Y. and I. Takebe. 1969: Plant & Cell Physiol. 10, 917-921.
- 78 Otsuki, Y. and I. Takebe. 1969: Virology 38, 497-499.

- 79 Otsuki, Y. and I. Takebe. 1976: J. Gen. Virol. 30, 309-316.
- 80 Otsuki, Y., T. Shimomura. and I. Takebe. 1972: Virology 50, 45-50.
- 81 Otsuki, Y., I. Takebe., C. Matsui. and Y. Honda. 1972: Virology 49, 188-194.
- 82 Paterson, R. and C. A. Knight. 1975: Virology 64, 10-22.
- 83 Pons, M. W. and G. K. Hirst. 1968: Virology 34, 385-388.
- 84 Premecz, G., T. Olah., A. Gulyas., A. Nytrai., G. Palfi. and G. L. Farkas. 1977: Pl. Sci. Letters 9, 195-200.
- 85 Renaudin, J., J. M. Bove., Y. Otsuki. and I. Takebe. 1975: Mol. Gen. Genet. 141, 59-68.
- 86 Robertas, I. M. and B. D. Harrison. 1970: J. Gen. Virol. 7, 47-54.
- 87 Romaine, C. P. and M. Zaitlin. 1978: Virology 89, 241-253.
- 88 Ryser, H. J.-P. 1968: Science 159, 390-396.
- 89 Sakai, F. and I. Takebe. 1972: Mol. Gen. Genet. 118, 93-96.
- 90 Sakai, F. and I. Takebe. 1974: Virology 62, 426-433.
- 91 Sakai, F., J. W. Watts., J. R. O. Dowson. and J. B. Bancroft. 1977: J. Gen. Virol. 34, 285-293.
- 92 Sarkar, S., M. D. Upadhaya. and G. Melchers. 1974: Mol. Gen. Genet. 135, 1-9.
- 93 Sawhney, R. K., W. E. J. Adams., J. Tsang. and A. W. Galston. 1977: Plant & Cell Physiol. 18, 1309-1317.
- 94 Schaskolskaya, N. D., G. N. Sacharovskaya. and E. V. Sacharova. 1973: Coll. Int. C. N. R. S. 212, 93-98.
- 95 Semal, J. and J. Kummert. 1970: J. Gen. Virol. 7, 193-302.
- 96 Semal, J. and R. I. Hamilton. 1968: Virology 36, 293-302.

- 97 Shatkin, A. J. 1969: Adv. Virus Res. 14, 63-87.
- 98 Shih, D. S., L. C. Lane. and P. Kaesberg. 1972: J. Mol. Biol. 64, 353-362.
- 99 Shih, D. S. and P. Kaesberg. 1973: Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 70, 1799-1803.
- 100 Shih, D. S. and P. Kaesberg. 1976: J. Mol. Biol. 103, 77-88.
- 101 Siegel, A., V. Hari., I. Montgomery. and K. Kolacz. 1976: Virology 73, 363-371.
- 102 Siegel, A., V. Hari. and K. Kolacz. 1978: Virology 85, 494-503.
- 103 Sugiyama, T., B. D. Korant. and K. K. Londbery-Holm. 1972: Ann. Rev. Microbiol. 26, 467-502.
- 104 Stussi-Garaud, C., J. Jemius. and H. Frankel-Conrat. 1977: Virology 81, 224-236.
- 105 Takanami, Y., S. Kubo. and S. Imaizumi. 1977: Virology 80, 376-387.
- 105 Takebe, I. 1975: Ann. Rev. Phytopath. 13, 105-125.
- 106 Takebe, I. 1977: In "Comprehensive Virology" 11, 237-283 (H. Frankel-Conrat. and R. R. Wagner., Eds.), Plenum Pub. Co. New York.
- 107 Takebe, I., G. Labib. and G. Melchers. 1971: Naturwiss. 58, 318-320.
- 108 Takebe, I., Y. Otsuki. and S. Aoki. 1968: Plant & Cell Physiol. 9, 115-124.
- 109 Takebe, I. and Y. Otsuki. 1969: Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 64, 843-848.
- 110 Van Kammen, A. 1972: Ann. Rev. Phytopath. 10, 125-150.
- 111 Van Vloten-Doting. and E. M. J. Jaspers. 1977: In "Comprehensive Virology" 11, 1-53 (H. Frankel-Conrat. and R. R. Wagner. Eds.) Plenum Pub. Co. New York.

- 112 Wyatt, S. D. and J. G. Shaw. 1975: Virology 63, 459-465.
- 113 Zaitlin, M. and R. N. Beachy. 1974: Adv. Virus Res. 19, 1-55.